



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PAPEL DE LA INTERLEUQUINA  
23 EN LA DIFERENCIACIÓN DE  
LAS CÉLULAS Th17**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor: Patricia Yagüe Sanz**

---

**Madrid, 2015**





**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE  
MADRID ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE  
INGENIEROS AGRÓNOMOS**



**GRADO DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**PAPEL DE LA INTERLEUQUINA 23 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS Th17**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Patricia Yagüe Sanz**

**MADRID,  
2015**

Director:

María de las Nieves Navarro  
Investigadora Ramón y Cajal  
Instituto de Investigación del Hospital de la Princesa

Rosario Haro Hidalgo  
Profesora de Microbiología  
Dpto de Biotecnología – Biología vegetal  
ETSIA-Universidad Politécnica de Madrid





## **PAPEL DE LA INTERLEUQUINA 23 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS Th17**

**Memoria presentada por PATRICIA YAGÜE SANZ para la obtención del título  
de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

**Fdo: Patricia Yagüe Sanz**

**VºBº Tutor y Director del TFG**

**Dra. María de las Nieves Navarro**

**Investigadora Ramón y Cajal**

**Instituto de Investigación del Hospital de la Princesa**

**VºBº Co-Tutor del TFG**

**Dra. Rosario Haro Hidalgo**

**Profesora de Microbiología**

**Dpto de Biotecnología – Biología vegetal**

**ETSIA-Universidad Politécnica de Madrid**

**Madrid, 29 Junio 2015**

,

A mi hermano  
y mis padres

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo supone la culminación del grado que empezó ya hace cuatro y a lo largo de los cuales he tenido el apoyo de muchas personas a las que tengo que agradecer haber llegado hasta aquí.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora, María, gracias a la cual ha sido posible la realización de este trabajo. A lo largo de este año he aprendido muchas cosas porque te sobran conocimientos y experiencia en este mundo. Es de admirar la dedicación que muestras en tu trabajo día a día y que se ve reflejado en tu disponibilidad siempre que te he necesitado.

También a mi tutora académica, Rosario Haro, que aunque el tema de este trabajo no estaba dentro de tu ámbito, has puesto un enorme interés por entender cada palabra y ayudarme en todo lo que estuviera a tu alcance.

Con la misma importancia, agradecer a mis padres y a mi hermano porque siempre estáis ahí, por vuestro incondicional apoyo en todo momento y por darme ánimos en los momentos difíciles, no se os puede reprochar nada. A mis amigas de siempre, Henar, Mónica y Vanesa, porque aunque hace cuatro años tomamos cada una nuestro camino no nos hemos separado. Y a los que he conocido en estos años de carrera, en especial a Carla, porque siempre estás dispuesta a ayudar y por esas largas conversaciones de teléfono antes de los exámenes, y Sara, que decir si no tengo ningún recuerdo de la universidad en el que no estés presente y por todos los que nos quedan fuera de la universidad.





# **ÍNDICE**

<b>SUMMARY/RESUMEN</b>	<b>xiv</b>
<b>CAPÍTULO 1. Introducción y objetivos</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos	4
<b>CAPITULO 2. Materiales y métodos</b>	<b>5</b>
2.1. Cultivo línea celular	5
2.2. Análisis de proteínas celulares mediante electroforesis y Western Blot	5
2.3. Fraccionamiento núcleo/citoplasma para mirar traslocación de STAT3 al núcleo	7
2.4. Inhibidores	8
2.5. Cultivo de diferenciación de células CD4+ primarias de ratón a Th17	8
2.6. Citometría de flujo y anticuerpos:	10
2.7. Tinción superficial e intracelular para análisis mediante citometría de flujo	11
<b>CAPÍTULO 3. Resultados</b>	<b>12</b>
3.1. Ajuste de las condiciones óptimas de respuesta a IL-23 en células Kit225	12
3.2. Transducción de señal en respuesta a IL-23	15
3.3. Estudio de la acción y consecuencias del uso de inhibidores específicos de quinasas Jak en la señalización de IL-23	17
3.4. Diferenciación de células CD4+ naïve a células Th17: efecto de la IL-23	20
3.5. Señalización activada en respuesta a IL-23 en células Th17 de células OT2 transgénicas	25
<b>CAPÍTULO 4. Discusión</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>30</b>

## **INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

### **INTRODUCCIÓN**

<b>Figura 1. Representación de la ruta de señalización de IL-23</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2. Ruta de señalización mediada por Jak quinasas</b>	<b>3</b>

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>Tabla I. Citoquinas</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Esquema representativo de la selección magnética de células TCD4+ naïve de nódulos linfáticos de ratón OT2</b>	<b>9</b>
<b>Figura 4. Esquema representativo de la selección magnético de la fracción enriquecida en APCs de bazo de ratón</b>	<b>10</b>
<b>Tabla II. Composición de Buffers y soluciones</b>	<b>6</b>
<b>Tabla III. Anticuerpos primarios fosfo-específicos y totales</b>	<b>7</b>
<b>Tabla IV. Inhibidores de las quinasas Jak usadas en este estudio</b>	<b>8</b>
<b>Tabla V. Anticuerpos conjugados usados en citometría de flujo</b>	<b>11</b>

### **RESULTADOS**

<b>Figura 5. Fosforilación de STAT3 por IL-23 e IL-2 en Kit225</b>	<b>12</b>
<b>Figura 6. Titulación de IL-23</b>	<b>13</b>
<b>Figura 7. Cinética IL-23</b>	<b>13</b>
<b>Figura 8. Traslocación de STAT3 al núcleo</b>	<b>14</b>
<b>Figura 9. Fosforilación de otros factores de transcripción</b>	<b>15</b>
<b>Figura 10. Activación de las rutas de señalización PI3K y mTORc1</b>	<b>16</b>
<b>Figura 11. Especificidad de los inhibidores AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib</b>	<b>18</b>
<b>Figura 12. Actividad y especificidad del inhibidor AZD1480</b>	<b>19</b>
<b>Figura 13. Actividad y especificidad del inhibidor Fedratinib</b>	<b>19</b>
<b>Figura 13. Actividad y especificidad del inhibidor Ruxolitinib</b>	<b>20</b>
<b>Figura 15. Porcentaje de células en los nódulos linfáticos</b>	<b>21</b>
<b>Figura 16. Porcentaje de células en los bazo</b>	<b>22</b>
<b>Figura 17. Esquema cultivo células CD4+ naïve aislado de ratones OT2</b>	<b>23</b>
<b>Figura 18. Producción de IL-17 e IFN-γ en los cultivos de células T CD4+ Th17</b>	<b>24</b>

<b>Figura 19. Curva de proliferación cultivos OT2</b>	<b>25</b>
<b>Figura 20. Fosforilación de factores de transcripción en respuesta a IL-23 en células Th17 de células OT2 transgénicas</b>	<b>26</b>

## **ABREVIATURAS, SÍMBOLOS**

**Akt**, serina/treonina quinasa, también conocida como Proteína quinasa B

**APC**, Células presentadoras de antígeno

**BFA**, brefeldina A

**BSA**, albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)

**CD**, grupo de diferenciación (cluster of differentiation)

**DMSO**, dimetilsulfóxido

**DNA**, ácido desoxirribonucleico (desoxiribonucleic Acid)

**EAE**, encefalomiелitis autoinmune experimental.

**et Al.**, y otros

**FBS**, suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)

**FITC**, Isotiocianato de fluoresceína

**Foxo**, factores de transcripción FOXO (Forkhead box proteins)

**FSC**, detector de dispersion frontal (Forward Scatter)

**G-CSF**, factor estimulante de colonias granulocíticas

**Gy**, Gray (unidad)

**HBSS**, tampón de incubación (Hanks Balanced Salt Solution)

**IFN- $\gamma$** , interferón gamma

**IL**, interleuquina

**IL-23R**, receptor de IL-23

**IMDM**, Iscove's Modified Dulbecco's Media

**IO**, Ionomicina

**Jak**, Janus quinasas

**kD**, kiloDalton

**MHC**, complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex)

**mTORc**, complejo diana de la rapamicina de mamífero (mammalian target of rapamycin complex)

**Ng/ml**, unidades del sistema internacional (concentración)

**NKT**, células T Natural killer

**OVA**, ovoalbúmina

**PBS**, tampón fosfato salino (Phosphate-buffered Saline)

**PDBu**, Forbol 12, 13 dibutirato

**PDK1**, piruvato deshidrogenasa quinasa lipoamide isoenzima 1

**PE**, ficoeritrina (phycoerytrin)

**PI3K**, fosfoinositol 3 quinasa.

**PM**, peso molecular

**RIPA**, Radio immunoprecipitation assay buffer

**ROR**, Receptor huérfano relacionado con el retinoide (RAR-related orphan receptor)

**RPMI**, Roswell Park Memorial Institute media

**RSK**, proteína quinasa ribosomal S6 (p90-S6K)

**S**, serina

**S6**, proteína ribosomal S6

**S6K**, proteína quinasa ribosomal S6 (p70-S6K)

**Scml**, proteína nuclear sex comb on midleg

**SDS-PAGEs**, electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida desnaturalizantes

**SSC**, detector de dispersión lateral (Side Scatter)

**STAT**, transductor de señales y activador de la transcripción (signal transducer and activator of transcription)

**SV**, estreptavidina

**T**, treonina

**TCR**, receptor de antígeno para células T (T Cell Receptor)

**TGF- $\beta$** , Factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor beta)

**Th**, células T helper

**Y**, tirosina

## **SUMMARY/RESUMEN**

The incidence of inflammatory and autoimmune diseases has increased among developed countries in the past 30 years, creating a demand for the development of effective and economic therapies for these diseases. Interleukin 23 (IL-23) is a pro-inflammatory cytokine whose increased production has been shown to play a key role in the establishment and maintenance of inflammatory and autoimmune diseases in different murine models such as inflammatory bowel disease, psoriasis and experimental autoimmune encephalomyelitis. More importantly, increased levels of IL-23 have been found in biopsies from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, and psoriasis. The pathological consequences of excessive IL-23 signalling have been linked to its ability to promote the production of interleukin 17 (IL-17), particularly in the subpopulation of CD4 T cells Th17. However, the precise molecular mechanisms by which IL-23 sustains the Th17 response and induces pathogenic effector functions in these cells remain largely unknown. The global objective of the experiments carried out in this work was to determine the effect of IL-23 on the proliferation, survival and IL-17 and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) production in Th17 cells. These experiments have shown that IL-23 does not promote proliferation or survival of in vitro generated Th17 cells, and that there is no difference in the production of IL -17 in the absence or presence of IL -23.

The IL-23 receptor, like other cytokine receptors, lacks intrinsic enzymatic activity. Instead, IL-23 receptor associates with members of the Janus tyrosine kinase family (Jaks). Cytokine binding to a Jak-associated receptor triggers the activation of the Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family of transcription factors. Previous work indicated that the IL-23 receptor complex is associated with the tyrosine kinases Jak2 and Tyk2 that promote STAT3 phosphorylation. Subsequent studies showed that IL23 activation of STAT3 induces the expression of the transcription factor ROR $\gamma$ t, which is crucial for IL-17 production. This work has explored the IL-23 signalling cascade, determining the optimal conditions for STAT3 activation and demonstrating the activation of other transcription factors such as STAT4, STAT5 and STAT1 that contribute to IL-23-mediated signalling pathways.

## **CAPÍTULO 1. Introducción y objetivos**

### **1.1. Introducción**

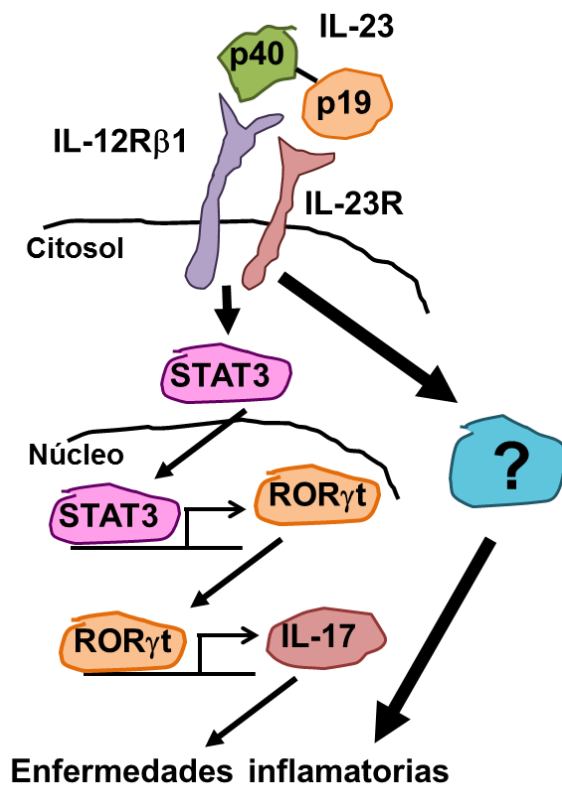
El cuerpo se protege de los agentes infecciosos y los daños que causan, y de otras sustancias nocivas por una variedad de células efectoras y moléculas que componen el sistema inmunológico. Tanto la respuesta inmune innata como adaptativa dependen de las actividades de glóbulos blancos o leucocitos. Estas células se originan en la médula ósea, y muchos de ellos también se desarrollan y maduran allí, otros como los linfocitos T migran al timo para seguir su desarrollo. Los linfocitos T ejercen un papel central durante la respuesta contra patógenos, activando la respuesta humoral y participando en la respuesta celular. Cada linfocito T tiene la capacidad de reconocer un antígeno específicamente gracias al receptor de antígeno de las células T (TCR), por tanto, existe una gran variedad de receptores que permitan reconocer todos los antígenos presentes en la naturaleza y desencadenar una respuesta específica <sup>(1)</sup>.

Dentro de los linfocitos T, existen distintos subgrupos: CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$  y células T Natural killer (NKT) <sup>(1, 2)</sup>. La subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresa en su membrana un TCR que reconoce péptidos antigénicos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), expresado en la membrana de células presentadoras de antígeno (APC). Este subgrupo, tras activarse por su primer encuentro con el antígeno, prolifera y se diferencia, dando lugar a distintos tipos de linfocitos T efectores (Th) con distintas funciones: Th1 (controlan las infecciones bacterianas), Th2 (controlan las infecciones de parásitos) o Th17 <sup>(1)</sup>. Las células Th17 son un linaje de las células T CD4<sup>+</sup> que se definen por la producción de interleuquina 17A (IL-17A) e interleuquina 17 (IL-17F) <sup>(3)</sup>. La IL-17 es una citoquina pro-inflamatoria que se encarga de regular a los neutrófilos y su efecto está mediado por genes inducidos por la IL-17 como son aquellos que codifican para el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) <sup>(4)</sup>. Las Th17 controlan las infecciones fúngicas y de bacterias extracelulares estimulando la respuesta de neutrófilos que ayudan a limpiar tales patógenos <sup>(1)</sup>. La diferenciación de estas células está controlado por el factor de transcripción Receptor huérfano relacionado retinoide (ROR $\gamma$ t) <sup>(3, 4)</sup>.

Estudios anteriores demostraron que la diferenciación in vitro de células T CD4<sup>+</sup> a células Th17 está promovida con una combinación de citoquinas como son la interleuquina 6 (IL-6), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), la interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleuquina 21 (IL-21), así como la necesidad de estimulación a través del TCR y promover la expresión del receptor de la interleuquina 23 (IL-23) <sup>(5, 6)</sup>. La IL-23 promueve la respuesta de las células Th17 <sup>(7, 8)</sup> (**Figura 1**). IL-23 induce la expresión de ROR $\gamma$ t, que es esencial para la

producción de IL-17<sup>(9)</sup>. Además se ha descrito que la IL-23 (producida por células dendríticas y macrófagos activados<sup>(10)</sup>, incrementa la producción de IL-17 en cultivos de células T<sup>(8)</sup>.

La IL-23 pertenece a la familia de la interleuquina 12 (IL-12). IL-12 está formada por las subunidades p35 y p40, sin embargo se descubrió una subunidad no relacionada con la p35, p19, y que era capaz de acoplarse a la subunidad p40, estas dos subunidades formarían lo que hoy llamamos IL-23<sup>(11)</sup> (**Figura 1**). La IL-23 es producida por células dendríticas y macrófagos activados<sup>(10)</sup>.



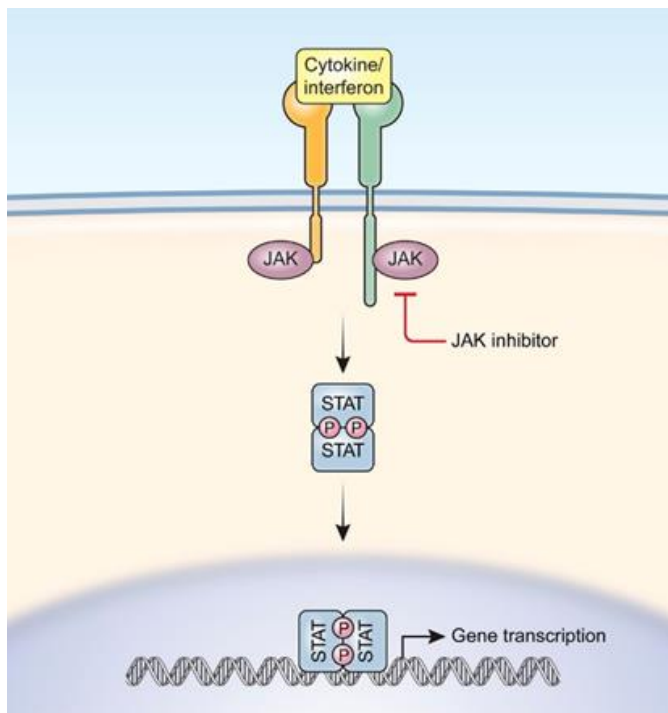
**Figura 1. Representación de la ruta de señalización de IL-23**

La IL-23 es una citoquina pro-inflamatoria cuya producción se ve aumentada en la inducción de inflamación crónica intestinal<sup>(12)</sup>. IL-23 también ejerce un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento de enfermedades autoinmunes inflamatorias como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo experimental en ratón que se utiliza como modelo de esclerosis múltiple<sup>(7)</sup>. Por ejemplo, se ha visto que ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>, deficientes en la subunidad p19 del receptor de IL-23, y ratones IL-12p40<sup>-/-</sup>, deficientes en la subunidad p40 que comparten los receptores de IL-23 e IL-12, son resistentes a EAE, mientras que ratones p35<sup>-/-</sup> que tienen ausencia específicamente de IL-12 son altamente susceptibles a EAE. En estudios para el desarrollo de una terapia para la EAE, el tratamiento con anti-IL-23p19 se ha asociado con una inhibición de las células T encefalitogénicas, reduciendo el número de células productoras de IL-17<sup>(13)</sup>. Por lo tanto, IL-23 es esencial para el desarrollo de inflamación autoinmune del sistema nervioso central<sup>(14)</sup>.



La IL-23 es reconocida por los receptores de membrana IL-23R y la IL-12R $\beta$ 1 que forman el complejo receptor IL-23 en las células que responden a IL-23<sup>(15)</sup> (**Figura 1**).

Una gran variedad de citoquinas emplean las cascadas de transducción asociadas con las tirosina quinasas Janus (Jaks)<sup>(16)</sup>. Tras el reconocimiento de la citoquina por su receptor específico en la membrana celular, las quinasas Jaks asociadas al receptor se activan y fosforilan los factores de transcripción, citoplasmáticos denominados transductores de señal y activadores de transcripción (STATs por sus siglas en inglés)<sup>(17)</sup>. La fosforilación mediada por Jak activa STAT, que a su vez se unen directamente al ácido desoxirribonucleico (DNA) y regulan la expresión génica<sup>(17)</sup> (**Figura 2**). La familia de las quinasas Jaks está compuesta por cuatro miembros: Jak1, Jak2, Jak3, y Tyk2, que se unen selectivamente a diferentes cadenas de distintos receptores de citoquinas<sup>(18, 19)</sup>. El uso selectivo de Jaks por diferentes receptores explica sus distintos papeles in vivo. Hasta la fecha, Jak2 y Tyk2 son las únicas quinasas identificadas en la señalización mediada por IL-23, que fosforilan STAT3<sup>(15)</sup>, induciendo la expresión de ROR $\gamma$ t necesario para la producción de IL-17 (**Figura 1**).



**Figura 2. Ruta de señalización mediada por Jak quinasas<sup>(20)</sup>.**

Por lo tanto, un análisis detallado de las cascadas de señalización reguladas por IL-23 en linfocitos Th17 es necesario para identificar mecanismos moleculares adicionales, y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos Th17.

## **1.2. Objetivos**

Este trabajo de fin de grado ha tenido como principal objetivo el estudio del papel de la IL-23 en la respuesta inmunitaria, y, en particular, la identificación de los mecanismos de señalización implicados en promover la función patológica de los linfocitos Th17. Los objetivos concretos de este trabajo han sido:

- 1. Estudio de la cascada de señalización de la IL-23 en la línea celular Kit225: Determinación de la respuesta óptima a IL-23.** Entre las condiciones que se han puesto a punto en estos experimentos preliminares se encuentra la dosis y cinética de estimulación con IL-23 para lograr una respuesta máxima en términos de fosforilación de STAT3, ya que el desencadenamiento del eje STAT3/ ROR $\gamma$ t / IL-17 es el único mecanismo regulado por IL-23 que ha sido implicado en patologías relacionadas con IL- 23.
- 2. La acción y consecuencias del uso de los inhibidores de la actividad quinasa de las Jaks AZD1480 (inhibidor Jak2), Fedratinib (inhibidor Jak2) y Ruxolitinib (inhibidor Jak2/Jak1) sobre la cascada de señalización de la IL-23.** Ajuste de la concentración de AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib para observar su efecto en la fosforilación de distintos factores de transcripción como son STAT5 y STAT3. También se ha explorado la especificidad de los inhibidores por distintos miembros de la familia Jak.
- 3. Estudio del papel de la IL-23 en la diferenciación de células T CD4+ naïve a Th17.** Análisis de diversas características de cultivos de diferenciación a Th17 de células de ratón OT2 como son la proliferación, supervivencia y producción de diversas citoquinas (IL-17 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ )) en condiciones con y sin IL-23 para ver qué consecuencias tiene esta citoquina en la diferenciación de las células CD4+ naïve (linfocitos maduros que no se han activado mediante la presentación de un antígeno) hacia Th17.

## **CAPITULO 2. Materiales y métodos**

### **2.1. Cultivo línea celular**

La línea celular linfoide humana Kit225 <sup>(21)</sup> se mantuvo en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute media) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100U/ml de penicilina y 100µg/ml estreptomycin (PAA, P11-010) e IL-2 (Tabla I) a una concentración de 2,5ng/ml. Para reducir las fosforilaciones mediadas por IL-2 y poder observar efectos mediados por otras citoquinas, las células fueron lavadas tres veces con RPMI 1640, y cultivadas en RPMI 1640 + 10% FBS pero en ausencia de IL-2 durante las 48 horas previas al experimento.

**Tabla I. Citoquinas.**

<b>Citoquina</b>	<b>Concentración de uso</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
IL-2	2,5 ng/ml	Novartis	Proleukin
IL-23	10ng/ml	R&D	Cat.1290-IL
IL-6	50ng/ml	Prepotec	Cat. 216-16
IL-21	10ng/ml	Prepotec	Cat. 210-21
IL-1β	10ng/ml	Prepotec	Cat. 221-11B
TGFβ	3ng/ml	Prepotec	Cat. 100-21

### **2.2. Análisis de proteínas celulares mediante electroforesis y Western Blot**

Las proteínas se extrajeron de las células mediante incubación con una solución de lisis (buffer RIPA) (**Tabla II**) a una concentración entre 20-30·10<sup>6</sup> células por ml de buffer RIPA. Tras incubar con agitación, las células lisadas se centrifugaron y recogió el sobrenadante que contiene las proteínas celulares extraídas. Las muestras se prepararon para electroforesis añadiendo a los lisados de proteína un agente reductor tris (2-carboxitil) fosfina (TCEP, Sigma) y NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies). Las proteínas celulares se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se utilizó 10% de acrilamida para detectar las proteínas de interés. Las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa que es bloqueada con una solución con leche para impedir uniones inespecíficas y son detectadas por Western blot con anticuerpos que reconocen fosforilaciones específicas de distintas proteínas (**Tabla III**). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios a una concentración 1/1000 (siguiendo las instrucciones de la casa comercial) en BSA buffer (**Tabla II**) durante 18 horas y a 4°C, tras los lavados son incubadas con los anticuerpos secundarios que lleva conjugado la enzima de peroxidasa a una dilución 1/5000 en tampón de bloqueo (0,5% de leche en TBS) durante 1 hora en agitación. Finalmente estas membranas se revelaron detectando

quimioluminiscencia, como sustrato se utilizó ECL Western Blotting (Bio-Rad), el ECL es un sustrato quimioluminiscente intensificado para la detección de la actividad peroxidasa de los anticuerpos secundarios. Para la detección de quimioluminiscencia se utilizó el sistema de imagen digital ImageQuant Las 4000, que proporciona imágenes digitalizadas de geles teñidos, membranas o películas. Para comprobar que la cantidad de proteína cargada en los distintos carriles del Western blot, una vez reveladas las membranas con los anticuerpos fosfo-específicos, se eliminó tanto el anticuerpo primario como secundario de las membranas con la solución de Stripping (**Tabla II**) y son incubadas de nuevo con el anticuerpo que reconoce la proteína total, es decir, en este caso no es fosfo-específico, las proteínas no fosforiladas también van a ser reconocidas.

**Tabla II. Composición de Buffers y soluciones.**

Buffer	Componentes
<b>Buffer ACK</b>	NH <sub>4</sub> Cl (0,4mM), KHCO <sub>3</sub> (10mM), EDTA (0,1mM)
<b>Buffer RIPA</b>	HEPES pH 7.4 (50mM), NaCl (150mM), NP40 (1%), Desoxicolato (0,5%), SDS (0,1%), Glicerol (10%), EDTA (1mM), EGTA (1mM), Inhibidores proteasas, TCEP (1mM),
<b>Buffer de lisis NP40</b>	Tris-HCl pH 7.5 (10mM), NaCl (10mM), MgCl <sub>2</sub> (3mM), EGTA (0.1mM), NP40 (0.05%), inhibidores proteasas, DTT (0.5mM)
<b>Buffer BSA</b>	TBS Tween 0,2%, 5% BSA
<b>Buffer Stripping</b>	0,7% β-mercaptoetanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris (pH 7.4)

**Tabla III. Anticuerpos primarios fosfo-específicos y totales.**

Anticuerpo primario	PM (kD)	Origen	Casa Comercial	Referencia
pSTAT3-Y <sub>705</sub>	79, 86	Conejo	Cell Signaling	9131
pSTAT3-S <sub>727</sub>	86	Conejo	Cell Signaling	9134
pSTAT5-Y <sub>694</sub>	90	Conejo	Cell Signaling	9351
pSTAT1-Y <sub>701</sub>	84, 91 ( $\alpha$ , $\beta$ isoformas)	Conejo	Cell Signaling	9167
pSTAT4-Y <sub>693</sub>	81	Conejo	R&D Systems	AF4319
PanSTAT3	79, 86	Ratón	Cell Signaling	9139
PanSTAT5	90	Conejo	Cell Signaling	9363
PanSTAT1	84,91	Conejo	Cell Signaling	9172
PanSTAT4	81	Conejo	Cell Signaling	5097
Tubulina	55	Ratón	Cell Signaling	2148
pS6 <sub>S240/244</sub>	32	Conejo	Cell Signaling	5364
pS6 <sub>S235/236</sub>	32	Conejo	Cell Signaling	2211
PanS6	32	Conejo	Cell Signaling	2217
pAKT <sub>T308</sub>	60	Conejo	Cell Signaling	9056
pAKT <sub>473</sub>	60	Conejo	Cell Signaling	9271
panAKT	60	Conejo	Cell Signaling	9272
pS6K <sub>T389</sub>	70	Conejo	Cell Signaling	9234
pS6K <sub>T421/S424</sub>	70	Conejo	Cell Signaling	9204
panS6K	70	Conejo	Cell Signaling	9202
pRSK <sub>T359/S363</sub>	90	Conejo	Cell Signaling	9344
pRSK <sub>S227</sub>	90	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	12445-R
panRSK	90	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-74575

### **2.3. Fraccionamiento núcleo/citoplasma para mirar traslocación de STAT3 al núcleo.**

Para recoger las proteínas citoplasmáticas, las células son lisadas con buffer de lisis NP40 (Tabla II) a una concentración entre  $20\text{-}30 \cdot 10^6$  células por ml de buffer. Las células se

centrifugaron a 2500rpm durante 15 minutos y a 4°C. Se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas citoplasmáticas. Las muestras se prepararon para electroforesis añadiendo a los lisados de proteína un agente reductor tris (2-carboxitil) fosfina (TCEP, Sigma) y NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies). El pellet se lavó para eliminar restos de proteínas citoplasmáticas, se añadió buffer RIPA (**Tabla II**), a la misma concentración que el buffer de lisis NP40, durante 20 minutos en agitación y a 4°C. Tras la incubación, se centrifugó quedando en el sobrenadante las proteínas nucleares extraídas. Las muestras se prepararon para electroforesis añadiendo a los lisados de proteína un agente reductor tris (2-carboxitil) fosfina (TCEP, Sigma) y NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies).

#### **2.4. Inhibidores:**

Los ensayos se han realizado usando tres tipos diferentes de inhibidores Jak quinasas (**Tabla IV**). Las células Kit225 fueron tratados con diferentes concentraciones de estos inhibidores durante 30 minutos, posteriormente se estudió la inhibición de la fosforilación de los factores de transcripción en los que están implicados tras la estimulación con IL-2 e IL-23 durante 30 minutos.

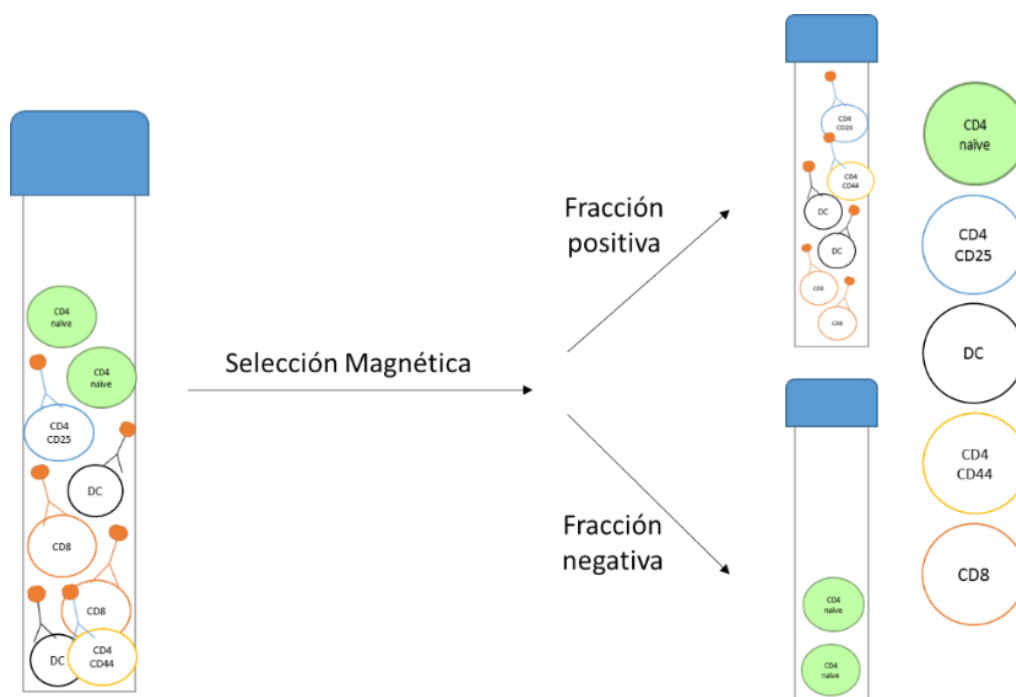
**Tabla IV: Inhibidores de las quinasas Jak usados en este estudio**

<b>Inhibidor</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
AZD1480	Jak2	Selleckchem	Catalog No.S2162
Ruxolitinib (INCB018424)	Jak1/Jak2	Selleckchem	Catalog No.S1378
Fedratinib (SAR302503, TG101348)	Jak2	Selleckchem	Catalog No.S2736

**2.5. Cultivo de diferenciación de células CD4+ primarias de ratón a Th17:** Las células T CD4+ naïve y las APCs fueron aisladas de los nódulos linfáticos y del bazo, respectivamente, de ratones OT2. Estos son ratones transgénicos para el TCR que expresan la cadena alfa y beta del TCR específico para el péptido de la ovoalbúmina de pollo (OVA 323-339, ISQAVHAAHAEINEAGR) <sup>(22)</sup>, es decir, todas las células T poseen el mismo TCR y van a reconocer el mismo péptido.

**Aislamiento de células T CD4+ naïve de nódulos linfáticos de ratón OT2:** Las células CD4+ naïve se purificaron de nódulos linfáticos siguiendo un protocolo de selección negativa mediante bolas magnéticas. Una vez disgregados los nódulos, se

incubaban con un cóctel de anticuerpos (contra células T CD8, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células B, células dendríticas, células NK, granulocitos y células T  $\gamma/\delta$ ), suplementado con anti-CD25-biotina y anti-CD44-biotina para eliminar las células CD4+ no naïve), una vez añadidas las bolas magnéticas y la muestra se pasa por un separador magnético automatizado (AutoMacs), se recogen todas las células que no están marcadas, esto es la fracción negativa (**Figura 3**).

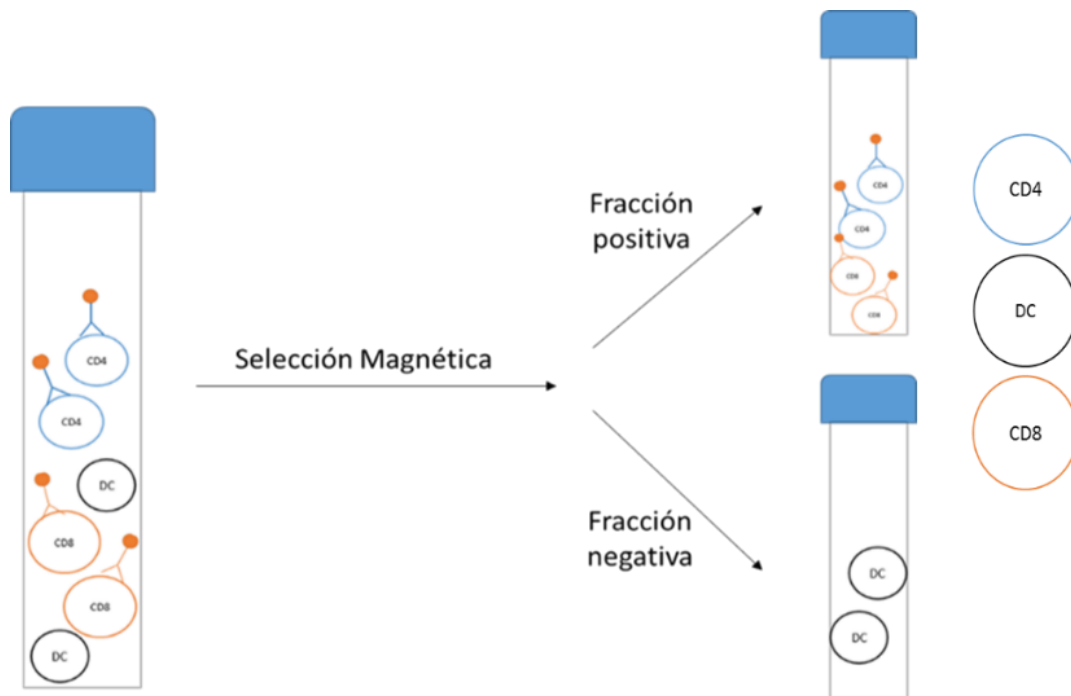


**Figura 3.** Esquema representativo de la selección magnética de células T CD4+ naïve de nódulos linfáticos de ratón OT2.

**Aislamiento de células presentadoras de antígeno de bazos de ratón:** las APC fueron purificadas de bazos por selección mediante bolas magnéticas, deplecionando las células T para que no compitan con las OT2. Una vez disgregado el órgano en una solución hipotónica (Buffer ACK, **Tabla II**) para lisar los eritrocitos, se añaden anticuerpos CD4 y CD8 biotinilados y tras la incubación se añaden las bolas magnéticas (**Figura 4**). En la fracción negativa vamos a recoger aquello que no esté marcado, es decir, todo aquello que no sea CD4 o CD8. Esta fracción enriquecida en células APCs se irradió con una dosis de radiación gamma de 25 Grays (Gy) para que la producción de citoquinas por parte de éstas no interfiera.

**Condiciones del cultivo OT2:** Los cultivos se inician con una proporción de 2 células APC por cada célula CD4+ naïve, con una densidad de cultivo de  $2 \cdot 10^6$  células/ml de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 10% FBS,

50 $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml estreptomicina (PAA, P11-010) y las citoquinas que proporcionan unas condiciones óptimas para la diferenciación hacia células Th17 (**Tabla I**).



**Figura 4. Esquema representativo de la selección magnética de la fracción enriquecida en APCs de bazo de ratón.**

## **2.6. Citometría de flujo y anticuerpos:**

Los análisis de citometría de flujo se han realizado en el FACSCanto II (BD Biociencias). La citometría de flujo es una tecnología que analiza simultáneamente múltiples características físicas y/o químicas de partículas individuales, por lo general células que fluyen en un fluido corriente a través de un haz de luz. Entre estas características se incluyen el tamaño (FSC, Forward Scatter), la complejidad (SSC, Side Scatter) o la intensidad de fluorescencia relativa. Estas se determinan usando un sistema de acoplamiento óptico-electrónico que registra cómo la célula o partícula dispersa la luz láser incidente y emite fluorescencia convirtiendo las señales ópticas en señales electrónicas proporcionales (pulsos de voltaje). Las células son marcadas con anticuerpos que reconocen específicamente un determinado antígeno. Cada anticuerpo está conjugado con un fluorocromo que emitirá una luz con una determinada longitud de onda que será detectada por el citómetro. Esta técnica permite la detección simultánea de múltiples antígenos en la superficie celular o intracelulares en células a nivel individual. Los anticuerpos



primarios usados para técnicas de citometría de flujo se describen en la **Tabla V**. El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo.

**Tabla V. Anticuerpos conjugados usados en citometría de flujo**

Anticuerpos	Conjugado	Casa comercial	Referencia
IL-17	PE	BD Biosciences	561627
IFN- $\gamma$	Aloficocianina	BD Biosciences	562017
CD4	FITC	BD Biosciences	553047
CD8	PE	BD Biosciences	555367
CD44	FITC	BD Biosciences	555478
CD25	Aloficocianina	BD Biosciences	555434
Estreptavidina	PerCp-Cy5.5	BD Biosciences	551419

## **2.7. Tinción superficial e intracelular para análisis mediante citometría de flujo:**

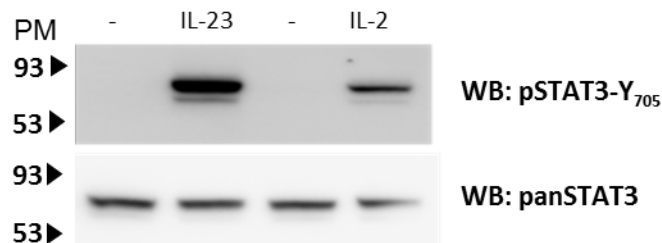
Para la tinción superficial las células se incubaron con los anticuerpos conjugados en tampón fosfato salino (PBS) 1% FBS, 1% albúmina de suero bovino (BSA) y 0,01% azida sódica durante 20 minutos a 4°C, se lavaron y analizaron.

Para la tinción intracelular de citoquinas, las células obtenidas de los cultivos in vitro se estimularon durante 4 horas con [20ng/ml] Forbol 12,13-dibutirato (PDBu, Calbiochem) y [0,5ng/ml] Ionomicina (IO, Calbiochem) a 37°C en presencia de Brefeldina A (1µl por ml de cultivo) (BFA, Golgi-Plug, BD Biosciences). El PDBu, análogo del diacilglicerol, y la IO imitan la activación del TCR, la BFA es un inhibidor del transportador de proteína de la membrana impidiendo el transporte de citoquinas al exterior quedando retenidas en el espacio intracelular. La tinción superficial se llevó a cabo con la incubación de las células con concentraciones saturantes de los anticuerpos en PBS 1% FBS, 1% BSA y 0,01% azida sódica durante 10 minutos a 4°C. Después de la tinción superficial, las células fueron fijadas con una solución de fijación (paraformaldehído, eBiosciences) durante 20 minutos a 4°C. La permeabilización y la tinción intracelular se llevaron a cabo en el mismo paso con la incubación con los anticuerpos fluorescentes de citoquinas en una solución de permeabilización (contiene saponina, eBiosciences) durante 30 minutos. Tras las incubaciones, se lavó el exceso de anticuerpo libre en solución de permeabilización. Las muestras se pasaron por el citómetro de flujo FACSCanto II y los datos fueron analizados en FlowJo.

## **CAPÍTULO 3. Resultados**

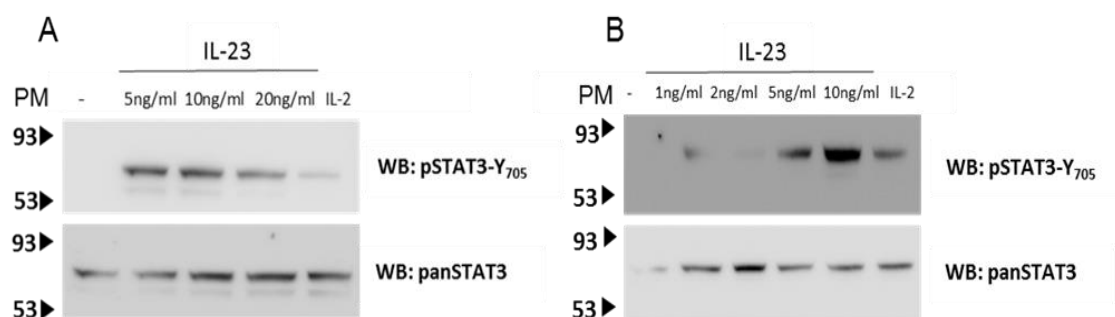
### **3.1. Ajuste de las condiciones óptimas de respuesta a IL-23 en células Kit225**

Para determinar las condiciones óptimas de respuesta a la IL-23 se ha examinado la activación del factor de transcripción STAT3 en la línea celular Kit225 que expresa el receptor de IL-23. Si las células están expresando el receptor de IL-23, la interleuquina es reconocida por dicho receptor y se inicia la cascada de señalización que implica la fosforilación de determinadas proteínas entre ellas STAT3. Hasta el momento, y como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, el único mecanismo conocido en la señalización mediada por IL-23 es la activación de este factor de transcripción. La línea celular Kit225 responde a IL-23 <sup>(15)</sup> y se puede ver un aumento de la fosforilación del factor de transcripción STAT3 en el residuo de tirosina que ocupa la posición 705 (pSTAT3-Y<sub>705</sub>) tras la estimulación con IL-23 (**Figura 5**). Para realizar este experimento, las células fueron privadas de IL-2 durante dos días, durante los cuales la activación llevada a cabo por la IL-2 se eliminará o disminuirá sus niveles para poder comprobar la fosforilación de determinadas proteínas a través de la IL-23 puesto que parte de las vías de señalización de estas dos citoquinas, en concreto la activación de STAT3, son comunes. Se estimularon las células con IL-23 o IL-2 durante 30 minutos. En estos experimentos, la condición tratada con IL-2 es nuestro control positivo <sup>(23)</sup>. La fosforilación que se observa es incluso más alta que con IL-2. Este experimento preliminar demuestra que la línea celular que estamos usando responde a IL-23.



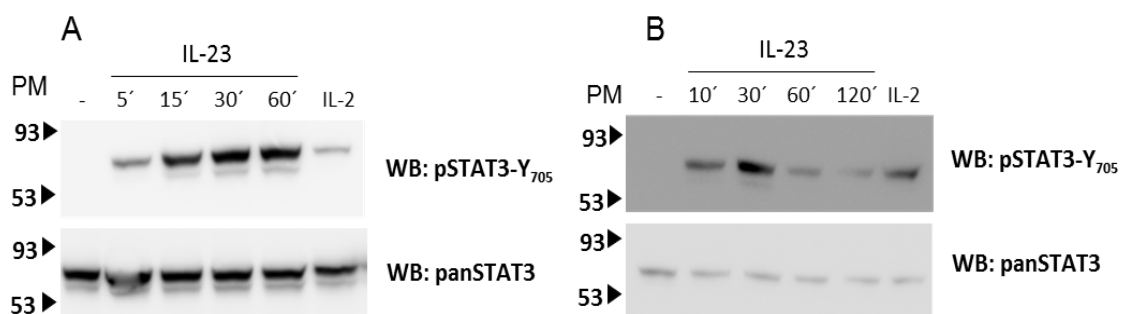
**Figura 5. Fosforilación de STAT3 por IL-23 e IL-2 en Kit225.** Las células Kit225 fueron estimuladas con IL-23 (10ng/ml), IL2 (20ng/ml), o se dejaron sin estimular (-) durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron lisadas y analizadas mediante electroforesis y western blot con anticuerpos específicos para detectar la fosforilación de STAT3 en el residuo Y<sub>705</sub> y la cantidad total de STAT3.

Para ajustar la concentración óptima de IL-23 para observar la máxima respuesta se analizó la fosforilación de STAT3 tras la estimulación de las células a diferentes concentraciones de IL-23 (**Figura 6A**). Las concentraciones de 5ng/ml y 10ng/ml no mostraron claras diferencia en la intensidad de la banda, por lo que se pasó a titular concentraciones menores de IL-23 (**Figura 6B**). Los datos indicaron que 10ng/ml es la concentración óptima para obtener los mejores resultados en cuanto a fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-23.



**Figura 6. Titulación de IL-23.** Las células Kit225 fueron estimuladas con IL-23 durante 30 minutos a concentraciones diferentes: **A)** 5ng/ml, 10ng/ml y 20ng/ml, usando como control negativo una condición sin estimular (-) y como control positivo la estimulación con IL-2. La fosforilación de STAT3 en el residuo Y<sub>705</sub> y la cantidad total de STAT3 se determinaron mediante western-blot. **B)** 1ng/ml, 2ng/ml, 5ng/ml y 10ng/ml, usando como control negativo una condición sin estimular (-) y como control positivo la estimulación con IL-2. La fosforilación de STAT3 en el residuo Y<sub>705</sub> y la cantidad total de STAT3 se determinaron mediante western-blot.

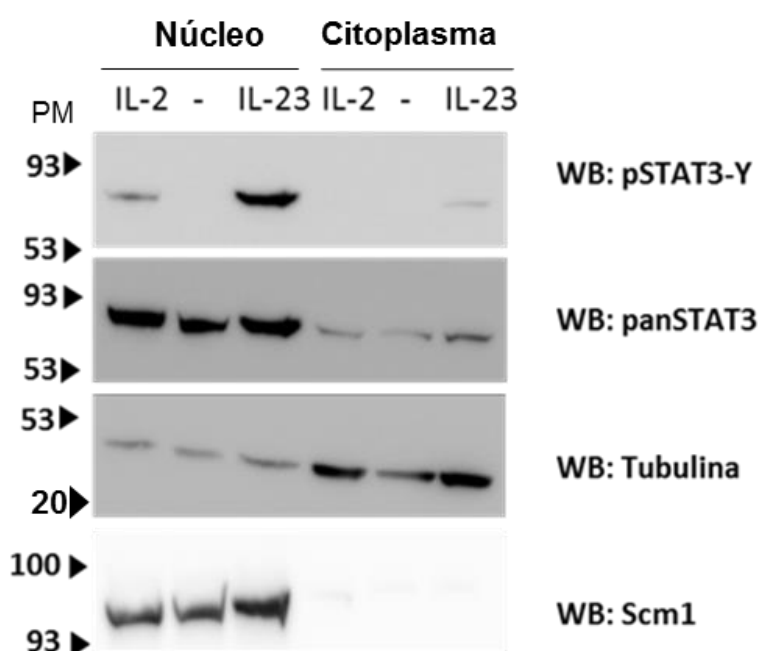
Tan importante como la concentración óptima es el tiempo de estimulación adecuado para observar la fosforilación de la proteína de interés. En una cinética de estimulación con IL-23 a distintos tiempos 5', 15', 30' y 60' podemos comprobar cuando el pico de fosforilación de STAT3 se encuentra en un nivel máximo y conocer así el tiempo óptimo de estimulación para posteriores experimentos (**Figura 7A**). En estos experimentos, se observó que la fosforilación de STAT3 llega a su máxima intensidad a los 30 minutos y se mantiene así hasta los 60 minutos. Sin embargo, en una cinética más larga hasta una estimulación de 120 minutos (**Figura 7B**) se puede comprobar que esta fosforilación decae a partir de los 60 minutos.



**Figura 7. Cinética IL-23.** Las células Kit225 se estimularon con IL-23 (10ng/ml) durante los tiempos indicados usando como control negativo una condición sin estimular (-) y como control positivo la estimulación con IL-2. La fosforilación de STAT3 en el residuo Y<sub>705</sub> y la cantidad total de STAT3 se determinaron mediante western-blot. **A)** Cinética de 60 minutos. **B)** Cinética de 120 minutos.

Una vez que STAT3 es fosforilado en el residuo de tirosina 705, se trasloca al núcleo donde se va a unir al DNA para activar la transcripción de distintos genes entre los que se encuentra el factor de transcripción ROR $\gamma$ t<sup>(9, 24)</sup>. Para comprobar la translocación al núcleo de STAT3 una vez que se ha fosforilado se utilizó un protocolo de fraccionamiento del núcleo y citoplasma para ver qué cantidad de esta proteína se trasloca al núcleo y qué parte se queda en el citoplasma

**(Figura 8).** En estos experimentos se utilizaron la tubulina y la proteína Scm1 (proteína nuclear, Sex comb on midleg) como marcadores de correcto fraccionamiento celular, puesto que la tubulina se encuentra en el citoplasma y Scm1 en la fracción nuclear. La mayor parte del STAT3 fosforilado tras la activación con IL-23 e IL-2 lo encontramos en el núcleo, en el citoplasma es casi inexistente. Sin embargo, en estos experimentos la cantidad de STAT3 no fosforilado en el núcleo, incluso en la condición sin estimular, es muy elevada. Puede que esta línea celular tenga alguna mutación que provoque una traslocación constitutiva al núcleo, por tanto estos resultados muestran que la línea Kit225 no sería adecuada para llevar a cabo estudios de traslocación de los factores STAT.

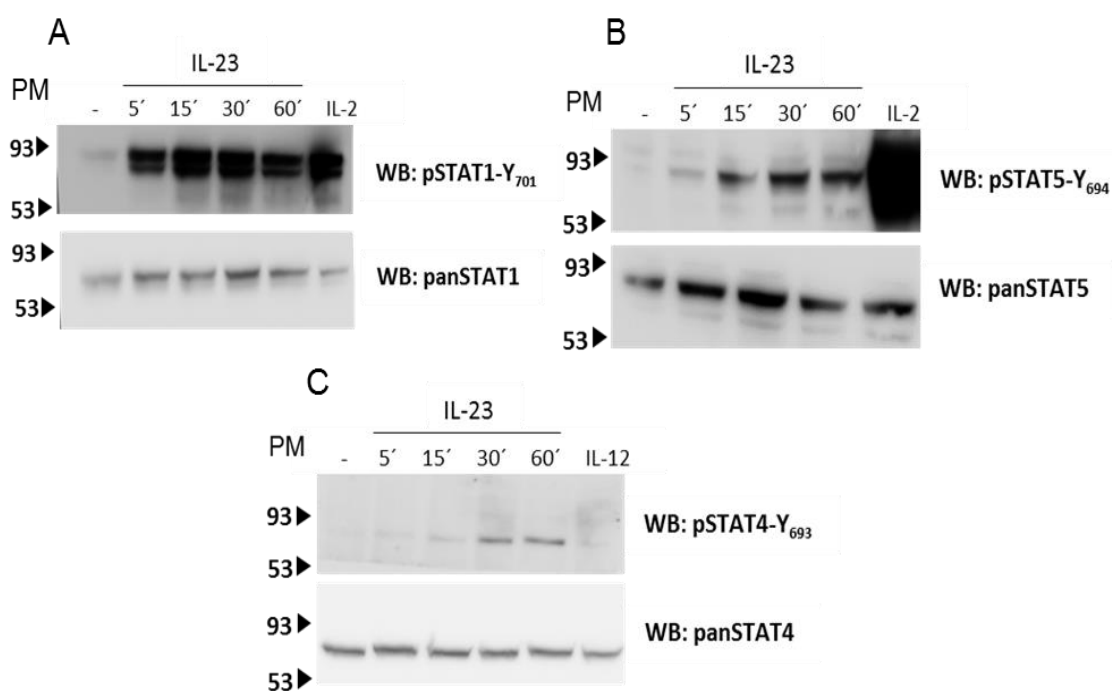


**Figura 8. Traslocación de STAT3 al núcleo.** Las células Kit225 se estimularon con IL-23 durante 30 minutos usando como control negativo una condición sin estimular (-) y como control positivo la estimulación con IL-2. Se utilizó un protocolo de fraccionamiento subcelular para separar las fracciones nuclear y citosólica. La fosforilación de STAT3 en el residuo Y<sub>705</sub> y la cantidad total de STAT3 se determinó mediante western-blot. La tubulina y Scm1 se utilizaron como marcadores de la fracción citosólica y nuclear, respectivamente.

Estos estudios preliminares demuestran que las mejores condiciones para obtener la respuesta óptima a IL-23 es el uso de dicha citoquina a una concentración de 10ng/ml durante una estimulación de 30 minutos. La intensidad de fosforilación máxima y su traslocación al núcleo demuestran la fosforilación de STAT3 y por tanto, su capacidad para llevar a cabo la transcripción de otros genes que están implicados en la respuesta a IL-23.

### 3.2. Transducción de señal en respuesta a IL-23

Una vez determinadas las condiciones óptimas de activación de STAT3 en respuesta a IL-23 en la línea Kit225, se analizaron otras vías de señalización activadas por otros receptores de citoquinas. Estudios previos mostraron que la IL-23 media la fosforilación de otros factores de transcripción como STAT4<sup>(25)</sup>, STAT1<sup>(15)</sup> y STAT5<sup>(15)</sup>, esta fosforilación puede estar mediada por Jak2 o Tyk2, o que se activen otras Jaks. Para comprobar la fosforilación de estos factores de transcripción se ha estimulado las células con IL-23 a distintos tiempos. La línea celular Kit225 con la que estamos trabajando muestra fosforilación de STAT1 en respuesta a IL-23, que aparece a los 5 minutos reflejando que se trata de una activación directa mediada por dicha interleuquina, lo mismo ocurre con la fosforilación de STAT5 que aumenta a los 15 minutos. Un resultado menos evidente muestra STAT4 en el residuo de tirosina 693, se observa fosforilación a partir de los 30 minutos, sin embargo el control positivo en el que las células han sido tratadas con IL-12 y que se sabe que fosforila STAT4 no muestra fosforilación, es posible que la línea celular con la que se está trabajando haya dejado de expresar el receptor de IL-12 (Figura 9).

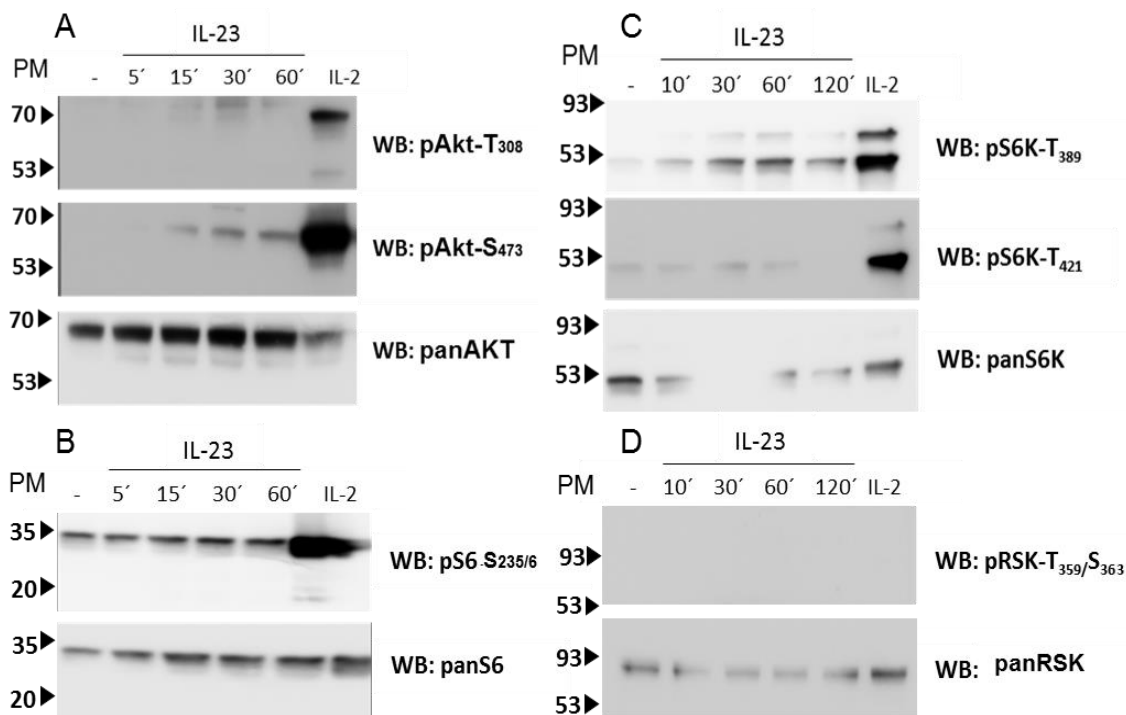


**Figura 9. Fosforilación de otros factores de transcripción.** Las células Kit225 se estimularon con IL-23 (10ng/ml), IL2 (20ng/ml), IL12 (10ng/ml) o se dejaron sin estimular durante los tiempos indicados. La fosforilación de los distintos STAT y la cantidad total proteína se determinaron mediante western-blot. A) STAT1, B) STAT5 y C) STAT4.

Se analizaron otras rutas de señalización mediadas por serina-treonina quinasas que pudieran estar implicadas en la señalización a través de la IL-23. La activación de estas quinasas y sus

sustratos se analizaron en una cinética de estimulación con IL-23, mediante electroforesis y Western Blot con anticuerpos fosfo-específicos. Entre las cascadas de señalización estudiadas están la ruta de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K por sus siglas en inglés) y la ruta complejo diana de la rapamicina de mamífero (mTORC1 por sus siglas en inglés) que propagan la señal desde la membrana celular al núcleo y determinan cambios transcripcionales que promueven a la diferenciación de células T. Para estudiar la vía de la PI3K se examinó la fosforilación de Akt, cuya fosforilación en el residuo treonina 308 está mediada por PDK1, y el residuo de serina 473 está fosforilado por mTORC2. El principal papel de Akt es la fosforilación y localización de los factores de transcripción Foxo, incluyendo Foxo1 y Foxo4, estos cuando son fosforilados por Akt salen del núcleo terminando su actividad transcripcional <sup>(26)</sup> (**Figura 10A**).

La segunda ruta examinada en respuesta a IL-23 es la ruta de mTORC1. mTORC1 fosforila la quinasa S6K1 (p70S6K) en los residuos de treonina 389 y serina 421/424, promoviendo su activación y la fosforilación la subunidad ribosomal S6 en dos residuos de serina S235/S236. La quinasa RSK1 (p90-S6K), fosforilada y activada por las quinasas Erk1/2, también participa en la fosforilación de S6 en las serinas 235/236 <sup>(26)</sup> (**Figura 10B, 10C, 10D**).



**Figura 10. Activación de las rutas de señalización PI3K y mTORC1.** Las células Kit225 son estimuladas con una concentración de IL-23 de 10ng/ml. La estimulación se realiza con distintas duraciones de tiempo para ver la cinética de fosforilación de las proteínas implicadas en las rutas de señalización de PI3K y mTORC1. La fosforilación y la cantidad total proteína se determinó mediante western-blot. **A)** Fosforilación de Akt. **B)** Fosforilación de S6. **C)** Fosforilación S6K y **D)** Fosforilación RSK.

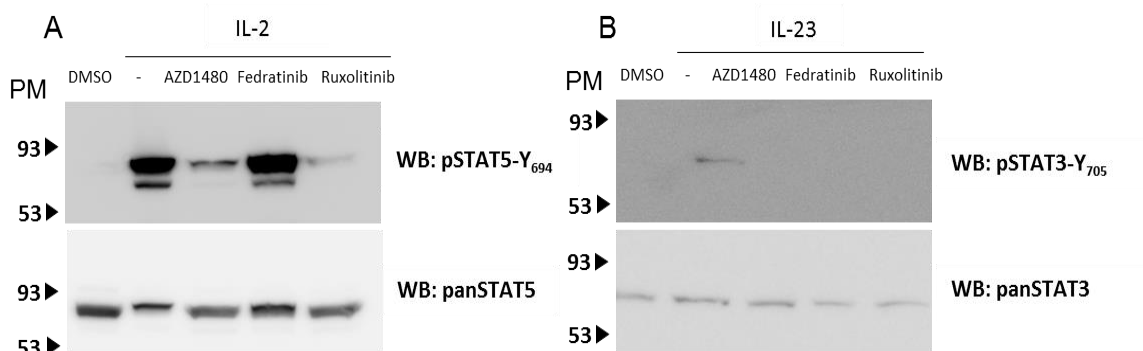
Únicamente se ve una fosforilación en el residuo 473 de Akt, esto indica una activación de mTORc2 pero no necesariamente la activación de PI3K. Estos estudios demuestran que la IL-23 no activa la ruta de señalización de PI3K ni la ruta de mTORC1, al menos directamente y en esta línea celular.

### **3.3. Estudio de la acción y consecuencias del uso de inhibidores específicos de quinasas Jak en la señalización de IL-23**

En estudios previos, de los cuatro miembros de la familia de las Jak quinasas, se ha identificado que la IL-23 activa sólo a las quinasas Jak2 y Tyk2, que llevarían a cabo la fosforilación de STAT3 mediada por dicha citoquina <sup>(15)</sup>. El uso de los inhibidores de Jak quinasas en estos experimentos nos ayuda a tener una herramienta más para el estudio de la vía de IL-23. Las Jaks presentan alta homología y es difícil obtener inhibidores específicos de una única JAK por lo que es necesario comprobar su especificidad. Los inhibidores AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib son inhibidores de Jak quinasas, por tanto, si la fosforilación de STAT3 está mediada por Jak2, el uso de un inhibidor específico de Jak2 bloquearía la fosforilación de este factor de transcripción. El inhibidor AZD1480 es un inhibidor con actividad sobre Jak2 <sup>(27)</sup>, Fedratinib también tiene como diana Jak2 <sup>(28)</sup> y Ruxolitinib inhibe tanto Jak1 y Jak2 <sup>(29)</sup>. En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos para comprobar la actividad de los tres inhibidores sobre Jak2 y en segundo lugar analizar su especificidad. Como se conoce bien que Jak1 y Jak3 son las quinasas que median la fosforilación de STAT5 en el tras la estimulación con IL-2 <sup>(23, 30)</sup> para ver si estos inhibidores son capaces de inhibir la fosforilación de STAT5 mediada por dicha interleuquina. Se incubaron las células Kit225 durante 30 minutos con los inhibidores AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib a una concentración de 0,5µM, 1µM y 1µM, respectivamente, después se estimulan con IL-2 (20ng/ml) durante 30 minutos, los lisados se corrieron por electroforesis y analizados por western-blot con anticuerpos fosfo-específicos (**Figura 11A**). De igual modo se comprobó la inhibición de Jak2 con la estimulación de IL-23 y analizando cómo cambia la fosforilación de su sustrato, STAT3 (**Figura 11B**).

El inhibidor AZD1480, como hemos mencionado, tiene actividad sobre Jak2. En los resultados del Western podemos ver que la fosforilación de STAT5 mediada por IL-2 en el residuo de tirosina 694 (STAT5-Y<sub>694</sub>) con este inhibidor disminuye respecto a la condición sin inhibidor (**Figura 11A**), por tanto no es específico de Jak2 aunque sí inhibe Jak2/STAT3 mediado por IL-23 (**Figura 11B**) también inhibe la fosforilación de STAT5. El segundo inhibidor, Fedratinib, también tiene como diana Jak2, en este caso la fosforilación de STAT5 mediada por IL-2 es igual a la condición no tratada con inhibidor (**Figura 11A**), por tanto no inhibe ni Jak1 ni Jak3 que están implicados en la fosforilación de STAT5-Y<sub>694</sub> pero sí inhibe IL-23/Jak2/STAT3

(Figura 11B). Y por último, Ruxolitinib, que inhibe tanto Jak1 y Jak2 por tanto y como se puede ver en la figura 11B, la fosforilación de STAT5-Y<sub>694</sub> se encuentra afectada.



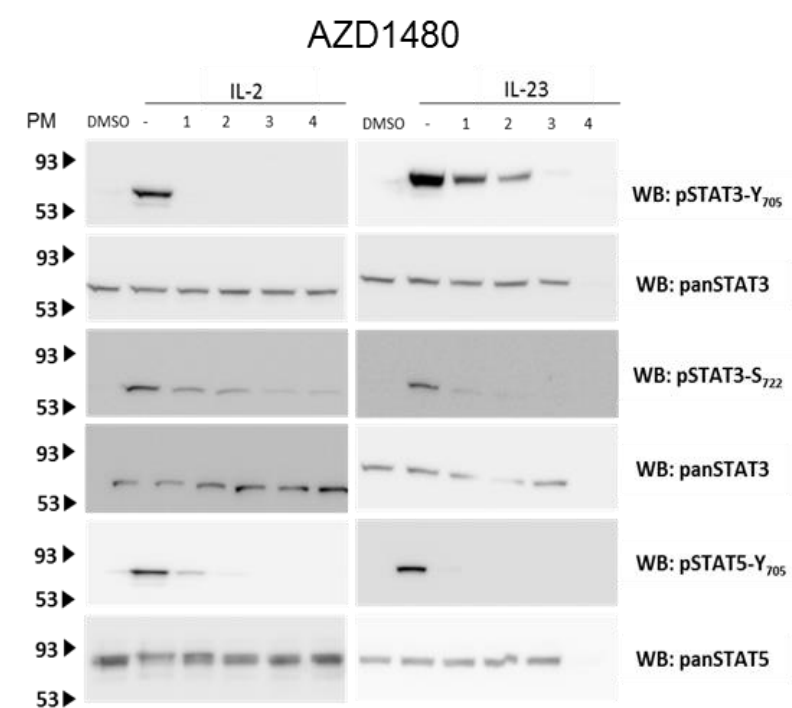
**Figura 11. Especificidad de los inhibidores AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib.** Las células Kit225 se incubaron con los inhibidores AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib a una concentración de 0,5μM, 1μM y 1μM, respectivamente, durante 30 minutos, después se incubaron con: **A)** IL-2 durante otros 30 minutos, como control positivo se usó las células estimuladas con IL-2 sin ser previamente tratadas con el inhibidor (-) y como control negativo DMSO que es la solución donde se ha resuspendido cada uno de los inhibidores. La fosforilación de STAT5 y la cantidad total de proteína se determinó mediante western-blot. **B)** IL-23 durante otros 30 minutos, como control positivo se usó las células estimuladas con IL-23 sin ser previamente tratadas con el inhibidor (-) y como control negativo DMSO que es la solución donde se ha resuspendido cada uno de los inhibidores. La fosforilación de STAT3 y la cantidad total de proteína se determinó mediante western-blot.

En los siguientes experimentos, se titularon distintas concentraciones de los inhibidores para determinar la cantidad óptima de inhibidores y si concentraciones elevadas propician su inespecificidad. Como controles positivos se usaron la IL-2 e IL-23 sin añadir previamente inhibidor y como control negativo una condición sólo con dimetilsulfósido (DMSO, solución en la que han sido resuspendidos los inhibidores) (**Figuras 12, 13, 14**). A parte de analizar la fosforilación de STAT5-Y<sub>694</sub> y el residuo de tirosina 705 de STAT3, se ha estudiado la fosforilación del residuo de serina 722 de STAT3 que también activa este factor de transcripción.

La IL-2 promueve la fosforilación de STAT5 mediante las quinasas Jak1 y Jak3<sup>(23, 30)</sup> por tanto si el inhibidor AZD1480 fuera específico/selectivo de Jak2, la fosforilación de STAT3 o STAT5 que desencadena la IL-2, tratando el cultivo previamente con este inhibidor, no debería estar afectada. Los resultados del Western Blot (**Figura 12**) muestran una inhibición de la fosforilación total para STAT3-Y<sub>705</sub> y una inhibición de la fosforilación de STAT5-Y<sub>694</sub> mediada por IL-2 (salvo a concentraciones de inhibidor muy bajas donde comienza a aparecer ya una banda). También se puede ver una disminución de la fosforilación de STAT3 para la serina para todas las concentraciones de inhibidor, siendo esta disminución mayor cuanto mayor es la concentración de AZD1480 usado. Las quinasas están implicadas en la fosforilación de los residuos de tirosina, la disminución de fosforilación del residuo de serina puede ser un efecto

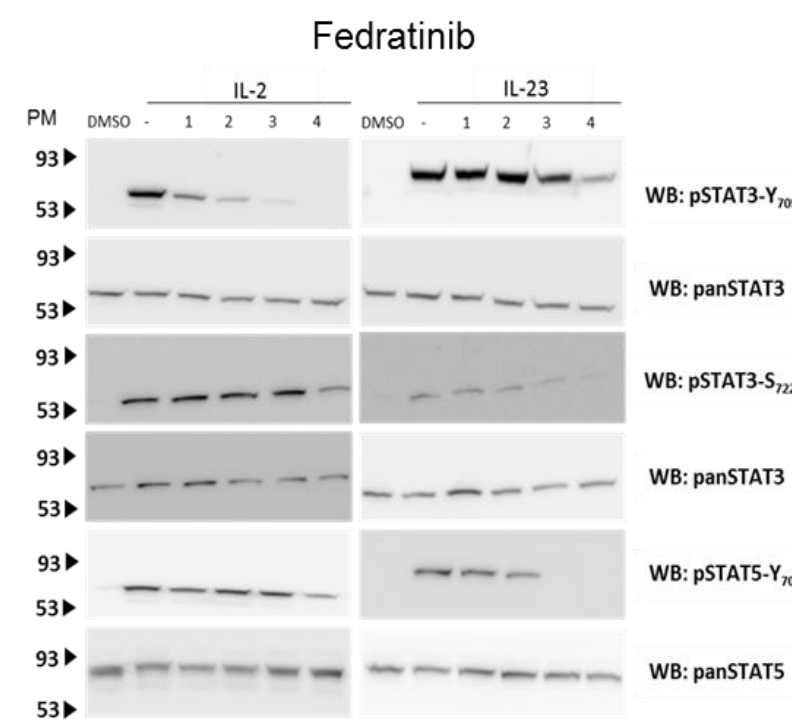


indirecto. Por tanto, AZD1480 actúa sobre Jak2, ya que en las células tratadas con IL-23 inhibe la fosforilación de STAT3 y STAT5 (**Figura 12**), incluido el residuo de serina de STAT3, pero no es específico al inhibir la fosforilación de STAT3-Y<sub>705</sub> o STAT5-Y<sub>694</sub> que desencadena la IL-2.



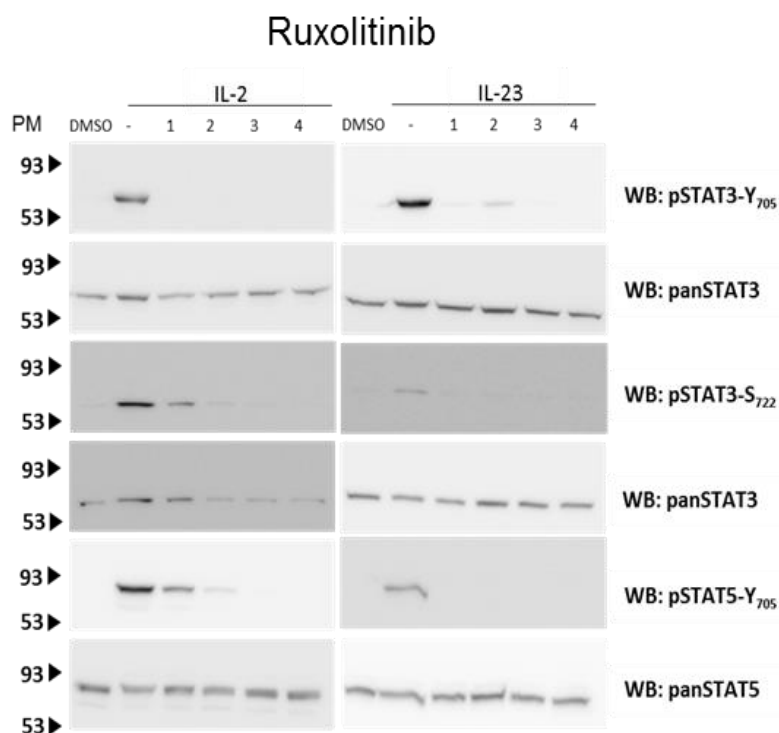
y la cantidad total de proteína se determinó mediante western-blot.

**Figura 12. Actividad y especificidad del inhibidor AZD1480.** Las células Kit225 fueron tratadas con el inhibidor a distintas concentraciones (1=0,0183μM, 2=0,055μM, 3=0,166μM, 4=0,5μM) durante 30 minutos a 37°C. Tras 30 minutos con el inhibidor, se estimulan las células con IL-23 (10ng/ml) o IL-2 (20ng/ml) durante 30 minutos a 37°C. Como control positivo se usó las células estimuladas con IL-2 o IL-23 sin ser previamente tratadas con el inhibidor y como control negativo DMSO. La fosforilación de los factores de transcripción



cantidad total de proteína se determinó mediante western-blot.

**Figura 13. Actividad y especificidad del inhibidor Fedratinib.** Las células Kit225 fueron tratadas con el inhibidor a distintas concentraciones (1=0,036μM, 2=0,11μM, 3=0,33μM, 4=1μM.) durante 30 minutos a 37°C. Tras 30 minutos con el inhibidor, se estimulan las células con IL-23 (10ng/ml) o IL-2 (20ng/ml) durante 30 minutos a 37°C. Como control positivo se usó las células estimuladas con IL-2 o IL-23 sin ser previamente tratadas con el inhibidor y como control negativo DMSO. La fosforilación de los factores de transcripción y la



**Figura 14. Actividad y especificidad del inhibidor Ruxolitinib.** Las células Kit225 fueron tratadas con el inhibidor a distintas concentraciones (1=0,036 $\mu$ M, 2=0,11 $\mu$ M, 3=0,33 $\mu$ M, 4=1 $\mu$ M.) durante 30 minutos a 37°C. Tras 30 minutos con el inhibidor, se estimulan las células con IL-23 (10ng/ml) o IL-2 (20ng/ml) durante 30 minutos a 37°C. Como control positivo se usó las células estimuladas con IL-2 o IL-23 sin ser previamente tratadas con el inhibidor y como control negativo DMSO. La fosforilación de los factores de transcripción y la cantidad total de

proteína se determinó mediante western-blot.

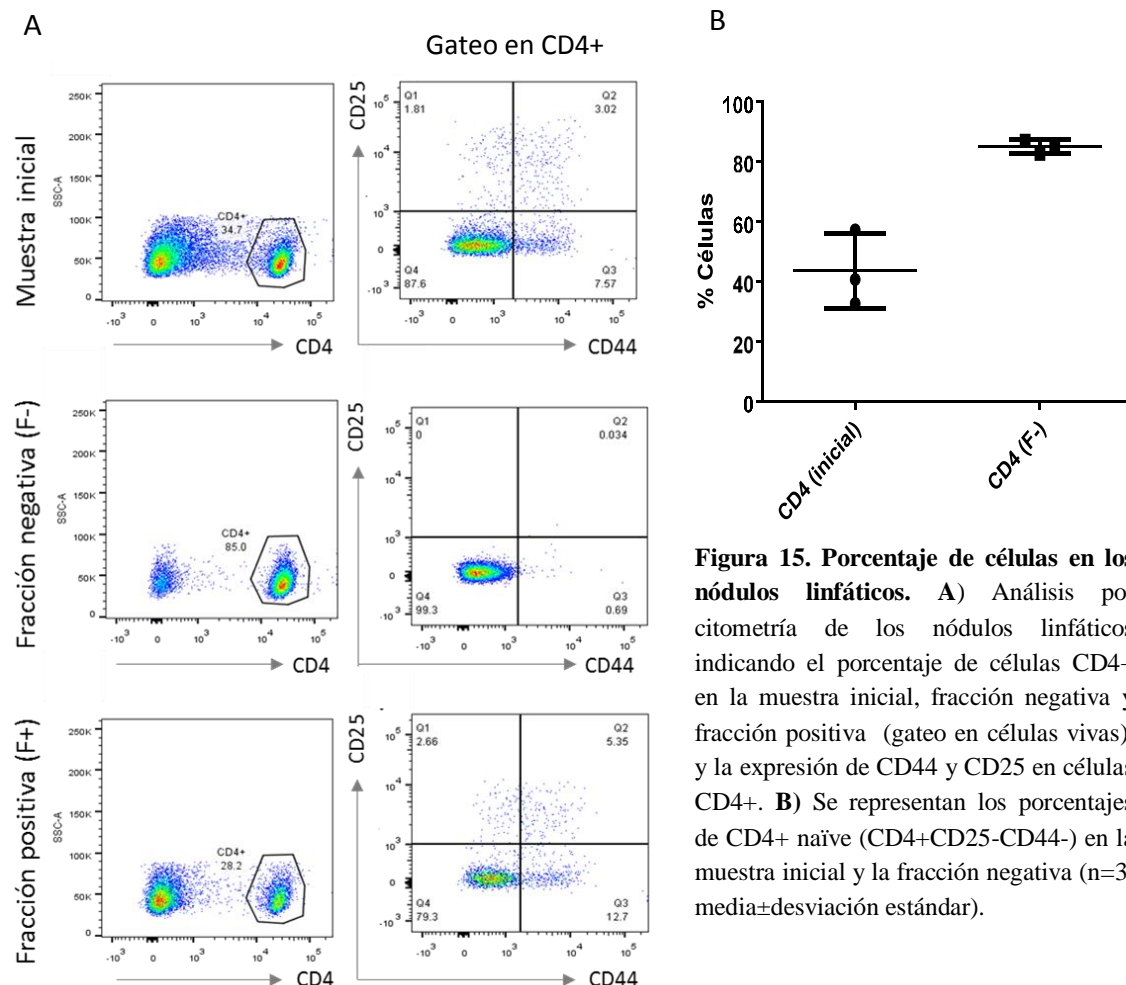
El inhibidor Fedratinib tiene más especificidad por Jak2. Con IL-2 y a concentraciones más elevadas de inhibidor disminuye levemente la fosforilación de STAT5-Y<sub>694</sub>, sin embargo la reducción de la fosforilación de STAT3-Y<sub>705</sub> es mayor (**Figura 13**). Por último Ruxolitinib, se observa un claro descenso, en las células tratadas con IL-23, en el nivel de fosforilación de los residuos de tirosina de STAT3 y STAT5 e incluso del residuo de serina del factor de transcripción STAT, por tanto, actúa sobre Jak2. Sin embargo, este inhibidor es inespecífico también se ve una disminución en las células tratadas con IL-2 (**Figura 14**).

#### **3.4. Diferenciación de células CD4<sup>+</sup> naïve a células Th17: efecto de la IL-23**

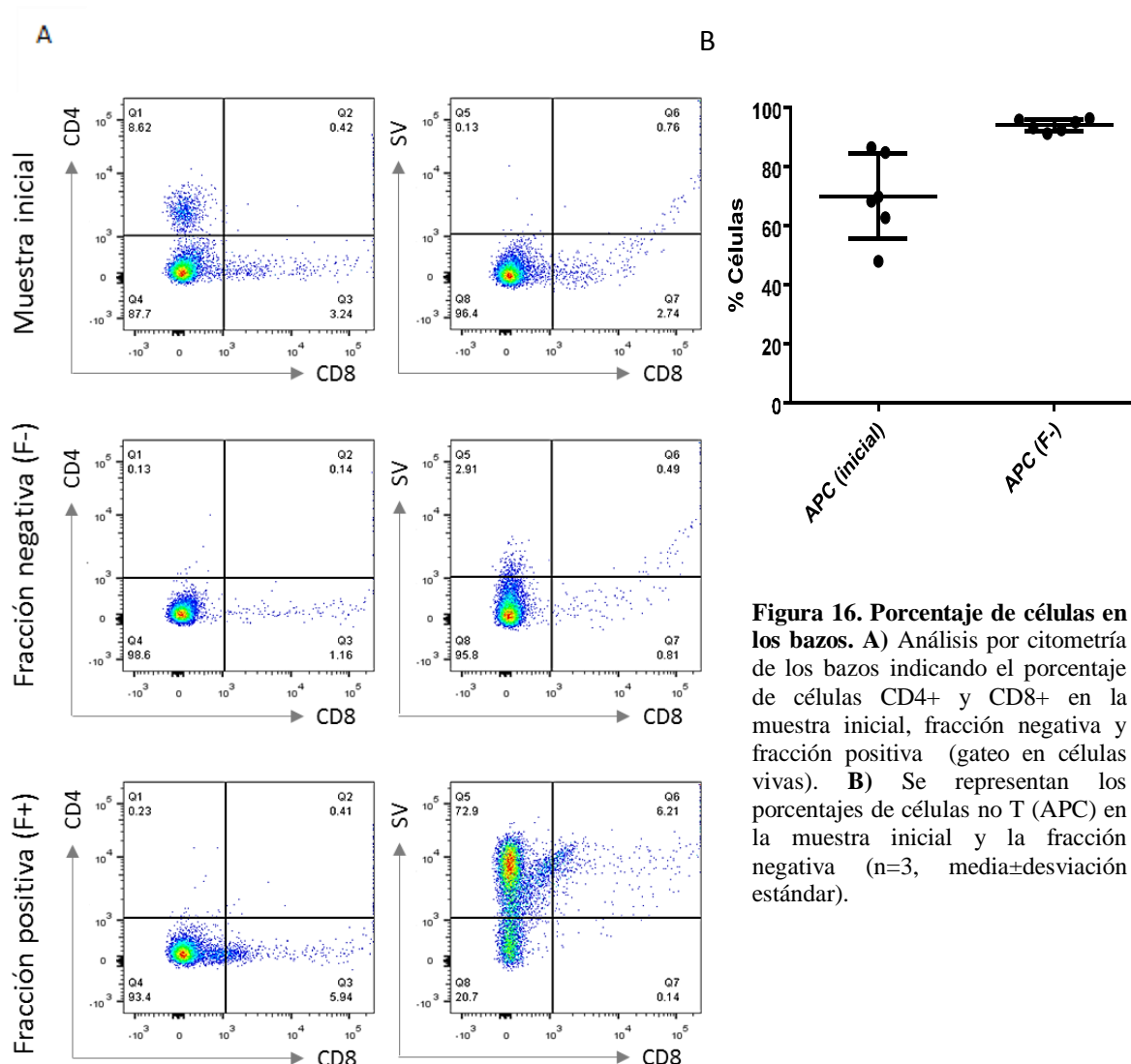
Una vez analizados los efectos y cambios que se producen como respuesta a la IL-23 en la línea celular Kit225, en cuanto a la activación de diferentes rutas de señalización, se pasó a estudiar el papel de la IL-23 en un sistema más relevante con células primarias de ratón. La IL-23 promueve la respuesta de las células Th17 incrementando la producción de IL-17 en cultivos de células T<sup>(7)</sup>. Para estudiar el número de células Th17 que se han diferenciado en condiciones de estimulación de IL-23 se analiza el porcentaje de células que producen de IL-17 como característica que define este linaje celular frente a la expresión de IFN- $\gamma$  que indica una diferenciación hacia un linaje Th1<sup>(1)</sup>. Se mantienen cultivos mixtos de CD4 naïve y APCs irradiadas bajo condiciones de diferenciación hacia Th17. De los nódulos linfáticos de los ratones OT2 se extraen las células CD4<sup>+</sup> naïve por selección magnética usando un cóctel de

anticuerpos biotinilados contra células T CD8, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, células B, células dendríticas, células NK, granulocitos y células T  $\gamma/\delta$  (no anticuerpos CD4+), además añadimos anticuerpos contra CD44+ y CD25+, para seleccionar sólo las células CD4+ naïve (CD4+CD44-CD25-). Las distintas fracciones se analizan por citometría de flujo (**Figura 15A**). Los cultivos primarios se iniciaron con una pureza entorno al 80-90% de células T CD4+ naïve (CD4+CD44-CD25-) (**Figura 15B**). El porcentaje promedio inicial de células T CD4+ en los nódulos del ratón OT2 está entorno al 40%. (**Figura 15B**). Sin embargo, no todas son células T CD4+ naïve (CD4+CD44-CD25-), hay células que expresan en su superficie marcadores de característicos de células de memoria (CD44) y células T reguladores (CD25), sin embargo y tras la selección el porcentaje de células T CD4+ que expresan CD44 y/o CD25 es menor del 1%.

Las células APC son aisladas, al igual que las células CD4+ naïve aisladas de los nódulos linfáticos, de los bazo de ratones OT2 por selección magnética obteniendo una fracción enriquecida en APCs que se analiza por citometría de flujo (**Figura 16A**). Se parte de un porcentaje de células APC promedio de 70% (**Figura 16B**), que tras la selección usando anticuerpos anti-CD4+ y anti-CD8+ en la fracción negativa se consigue un porcentaje mayor del 90% (**Figura 16B**).



**Figura 15. Porcentaje de células en los nódulos linfáticos.** A) Análisis por citometría de los nódulos linfáticos indicando el porcentaje de células CD4+ en la muestra inicial, fracción negativa y fracción positiva (gateo en células vivas), y la expresión de CD44 y CD25 en células CD4+. B) Se representan los porcentajes de CD4+ naïve (CD4+CD25-CD44-) en la muestra inicial y la fracción negativa (n=3, media±desviación estándar).

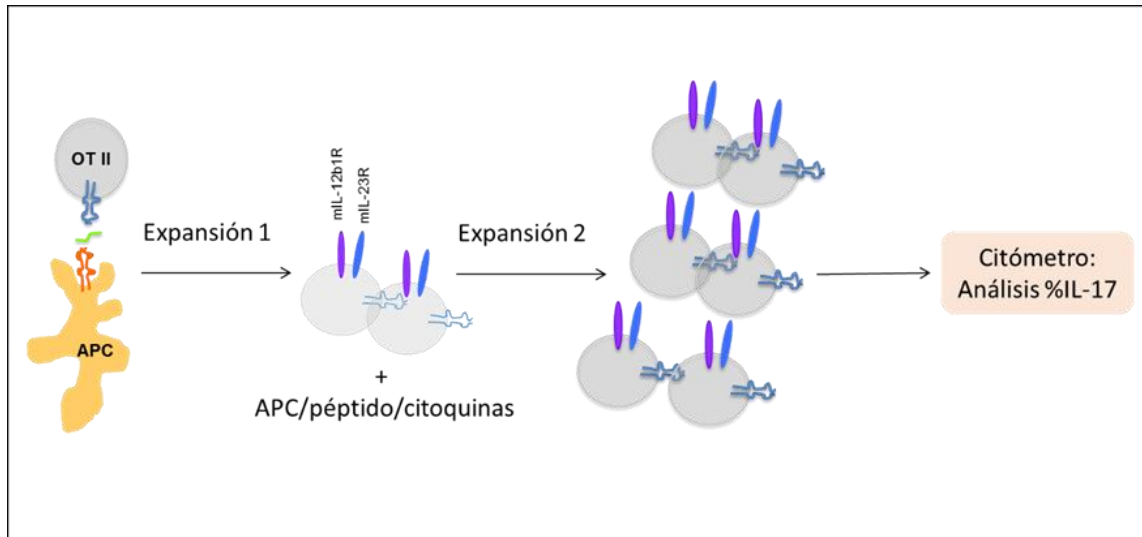


**Figura 16. Porcentaje de células en los bazo.** **A)** Análisis por citometría de los bazo indicando el porcentaje de células CD4+ y CD8+ en la muestra inicial, fracción negativa y fracción positiva (gateo en células vivas). **B)** Se representan los porcentajes de células no T (APC) en la muestra inicial y la fracción negativa (n=3, media±desviación estándar).

Las células de la fracción negativa de la selección de los nódulos linfáticos del ratón son cultivadas junto a la fracción negativa de los bazo donde se encuentran las APC después de que éstas sean irradiadas para que no produzcan citoquinas y no interfieran en las condiciones de cultivo.

La relación de células con la que se inicia el cultivo corresponde al ratio 1:2, una célula T por cada dos APC y a una densidad de cultivo de  $2 \cdot 10^6$  células/ml en medio IMDM. Se añaden citoquinas que favorecen unas condiciones para la diferenciación de las células T CD4+ naïve hacia células Th17: TGF $\beta$  (3ng/ml), IL-6 (50ng/ml), IL-1 $\beta$  (10ng/ml) e IL-21 (10ng/ml). Además se añade el péptido de la ovoalbúmina (OVA 323-339, ISQAVHAAHAEINEAGR) a una concentración de 5 $\mu$ g/ml<sup>(5, 6)</sup>. Se llevan dos cultivos paralelos con y sin IL-23 a una concentración de 10ng/ml. Tras mantener los cultivos a 37°C durante 4 días, se pasa a analizar la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  de ambas condiciones, comparando la producción basal y tras la estimulación con PDBU/IO que mimetiza la estimulación a través del TCR. El día 4 el cultivo

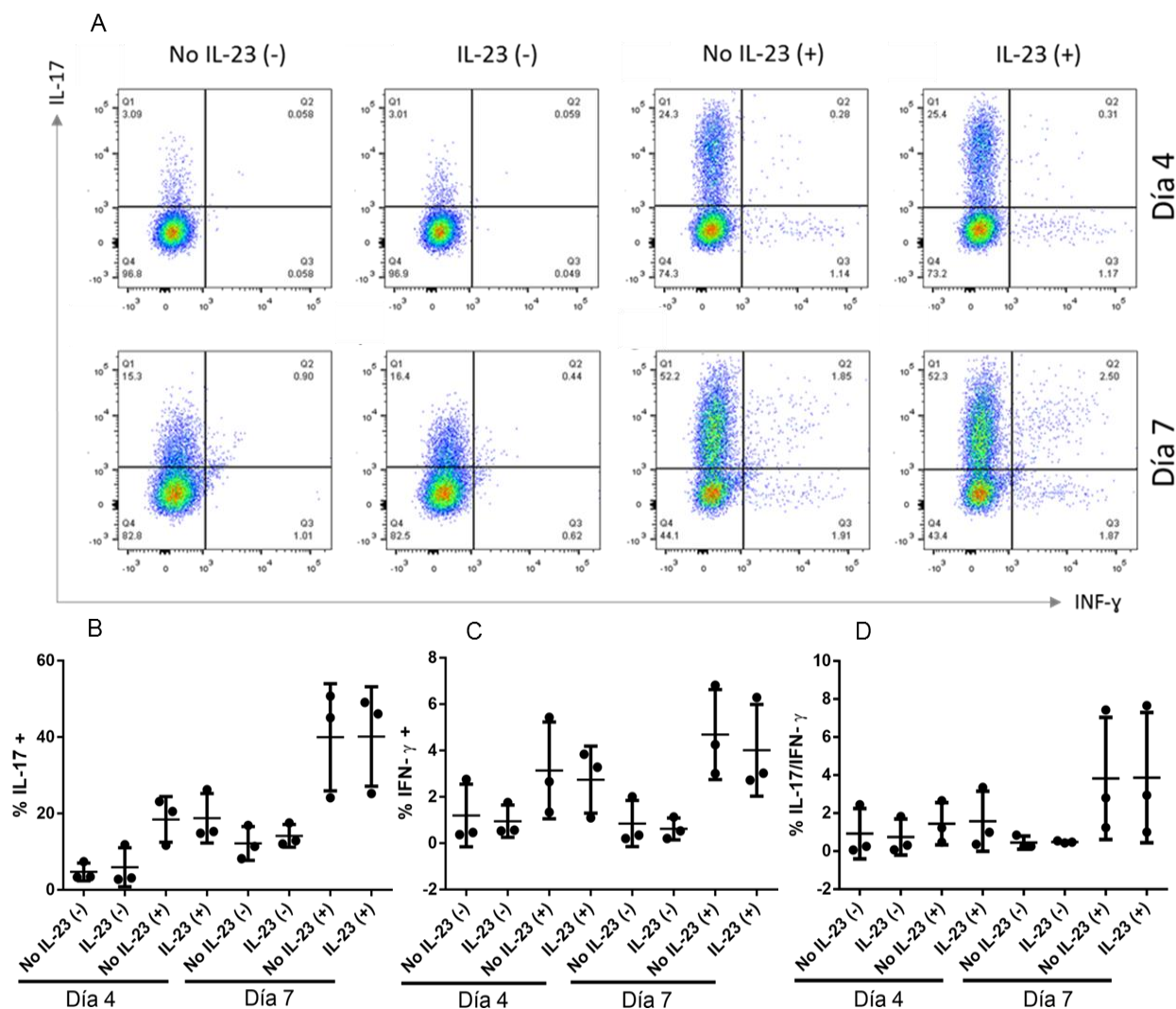
se reestimula con APCs y se refresca con citoquinas y el péptido con las concentraciones usadas en el día 0 del cultivo. Manteniendo los cultivos a 37°C hasta el día 7 del cultivo que se vuelve a analizar la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  de ambas condiciones, comparando la producción basal y tras la estimulación con PDBU/IO (**Figura 17**).



**Figura 17. Esquema cultivo células CD4+ naíve aisladas de ratones OT2.**

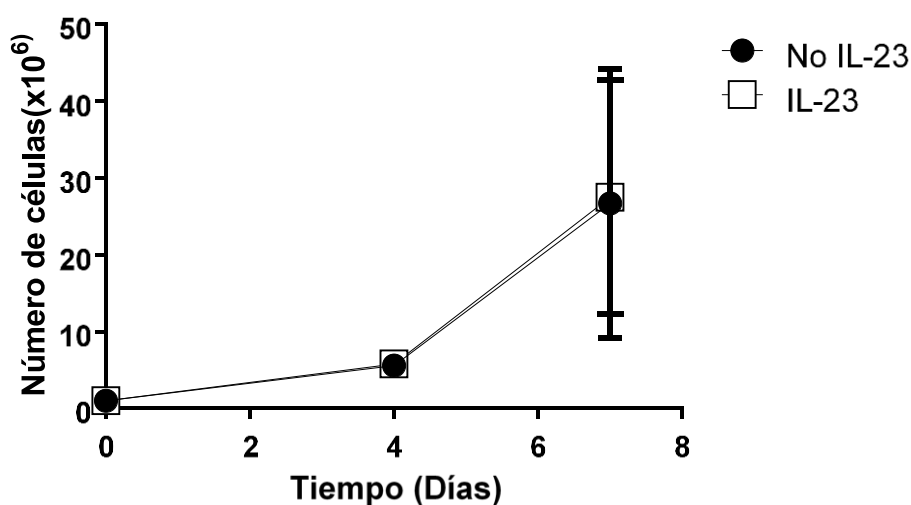
El análisis de la producción de IL-17 de las células de los cultivos de células T CD4+ naíve se realiza por citometría de flujo con los siguientes anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos: IL-17-PE, IFN- $\gamma$ -aloficocianina, CD4-FITC (**Figura 18**).

En los datos se observa una producción de IL-17 cuando las células son activadas y esta producción manifiesta un aumento de casi 3 veces el día 7 del cultivo respecto del día 4. El porcentaje promedio de producción de IL-17 el día 7 de cultivo está entorno al 40%. En los resultados anteriores no se ve una diferencia en la expresión de IL-17 entre los cultivos tratados con IL-23 y los que no se añade IL-23, no contribuyendo esta citoquina en la diferenciación de las células T CD4+ en estas condiciones. Del mismo modo, no se ven diferencias en la expresión de IFN- $\gamma$  o un aumento en la doble positivas para ambas citoquinas, población que también se ha visto que contribuye a la patogenicidad <sup>(31)</sup>.



**Figura 18. Producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  en los cultivos de células T CD4<sup>+</sup> Th17.** **A)** Representación de citometría de flujo de la expresión de IL-17 e IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> en las dos condiciones de cultivo: No IL-23 e IL-23. Se analizan ambas sin estimular (-) o con tras la 4 horas de estimulación con PDBU [20ng/ml]/IO [0,5ng/ml] (+) en el día 4 y día 7 del cultivo. **B)** Porcentaje de células productoras de IL-17 por células T CD4<sup>+</sup> en las dos condiciones de cultivo: No IL-23 e IL-23. Se analizan ambas sin estimular (-) o con tras la 4 horas de estimulación con PDBU [20ng/ml]/IO [0,5ng/ml] (+) en el día 4 y día 7 del cultivo. **C)** Porcentaje de expresión de IFN- $\gamma$  en las dos condiciones de cultivo: No IL-23 e IL-23. Se analizan ambas sin estimular (-) o con tras la 4 horas de estimulación con PDBU [20ng/ml]/IO [0,5ng/ml] (+) en el día 4 y día 7 del cultivo. **D)** Porcentaje de expresión de IL-17/IFN- $\gamma$  en las dos condiciones de cultivo: No IL-23 e IL-23. Se analizan ambas sin estimular (-) o con tras la 4 horas de estimulación con PDBU [20ng/ml]/IO [0,5ng/ml] (+) en el día 4 y día 7 del cultivo. (n=3, media $\pm$ desviación estándar).

Durante el cultivo se ha hecho un seguimiento de la proliferación de los cultivos para observar si la IL-23 induce una mayor expansión de las células. Ambas poblaciones muestran una proliferación con una media de 30 veces respecto al número de células inicial (**Figura 19**).

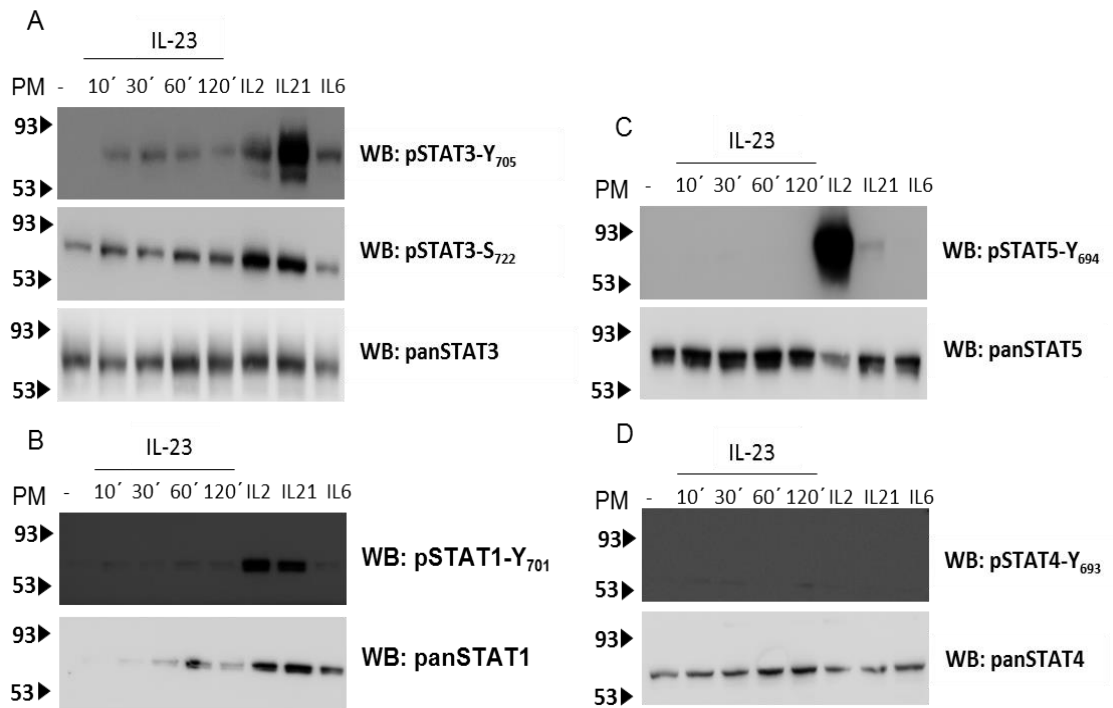


**Figura 19. Curva de Proliferación cultivos OT2.** Las gráficas muestran la proliferación de las células T CD4+ en los 7 días de cultivo desde el día 0 de inicio de cultivo, a los cuatro días cuando son reestimuladas con APC y al día 7 del cultivo. Las células son contadas en el microscopio óptico usando la tinción con Trypan que se introduce en las células muertas, dejando las vivas brillantes. (n=3, media±desviación estándar).

Los resultados obtenidos, al igual que la expresión de IL-17 en ambos cultivos, no muestra diferencias entre la proliferación del cultivo con IL-23 y sin IL-23.

### **3.5. Señalización activada en respuesta a IL-23 en células Th17 de células OT2 transgénicas**

Al igual que se hizo con las células Kit225, se analizó la respuesta a IL-23 en células Th17 diferenciadas a partir de células CD4+ naïve y comprobar en este sistema si también se presentan las fosforilaciones en los factores de transcripción que se observa en la línea celular, las fosforilaciones en los factores de transcripción de la familia STAT serán de particular interés para identificar otras rutas de señalización y diseño de inhibidores contra estas dianas que pueden ayudar a disminuir la patogenicidad mediada por la IL-23. Las células Th17 mantenidas en cultivo durante 7 días con IL-23, se lavaron y se incubaron sólo con medio durante 4 horas. Posteriormente se procedió a hacer la cinética del mismo modo que se llevó a cabo con los cultivos de células T CD4+ diferenciadas a Th17 de ratones OT2 (**Figura 20**).



**Figura 20. Fosforilación de factores de transcripción en respuesta a IL-23 en Th17 de células OT2 transgénicas.** Las células Th17 mantenidas en cultivo durante 7 días con TGFβ (3ng/ml), IL-6 (50ng/ml), IL-1β (10ng/ml), IL-21 (10ng/ml), el péptido de la ovoalbúmina (OVA 323-339, ISQAVHAAHAEINEAGR) (5μg/ml) e IL-23 (10ng/ml). Tras lavarlas e incubarlas a 37°C sin citoquinas fueron estimuladas con IL-23 (10ng/ml) a distintos tiempos. Como controles positivos se utilizó IL-2, IL-21 e IL-6. La fosforilación de los factores de transcripción y la cantidad total de proteína se determinó mediante western-blot.

Al igual que en la línea celular, se observa fosforilación del factor de transcripción STAT3 en respuesta a IL-23 y una leve fosforilación de STAT1. Sin embargo, no se demuestra la fosforilación de los factores de transcripción STAT4 y STAT5 en células primarias.



## **CAPÍTULO 4. Discusión**

En este trabajo se han explorado distintos aspectos de la vía de señalización de la citoquina pro-inflamatoria IL-23 que tiene un papel crucial en la patogénesis de la autoinmunidad. En primer lugar hemos utilizado la línea Kit225 para determinar las condiciones óptimas de la respuesta a IL-23 en términos de la fosforilación y activación del factor de transcripción STAT3. En estos experimentos hemos encontrado que la línea Kit225 responde a IL-23 que podemos comprobar por la inducción de fosforilación de la tirosina del factor STAT3 siendo la estimulación con una concentración de IL-23 de 10ng/ml y un tiempo de 30 minutos las mejores condiciones para una respuesta óptima. Además se observa la fosforilación de la tirosina de otros factores de transcripción como son STAT5 y STAT1 que son fosforilados por IL-2 y como habían demostrado experimentos anteriores también experimentan fosforilación por IL-23<sup>(15)</sup>. La fosforilación del STAT4, que revelan otros estudios en Kit225 tras la estimulación con IL-23, en este trabajo no es demasiado evidente<sup>(15, 25)</sup>. Se observa fosforilación de la tirosina de STAT4 a partir de los 30 minutos, sin embargo la estimulación con IL-12, nuestro control positivo, no muestra fosforilación. La línea celular puede haber perdido la expresión del receptor de IL-12, al no estar éste presente en la membrana, la cascada de señalización mediada por IL-12, que implica la fosforilación de STAT4, no se lleva a cabo. Estos factores de transcripción son proteínas responsables del mantenimiento de funciones celulares, y por lo tanto, su regulación es una diana terapéutica potencial. El receptor IL-23, al igual que otros receptores, no tienen actividad enzimática intrínseca. Las subunidades del receptor de la IL-23 se acoplan a Jak2 y Tyk2<sup>(15, 25)</sup>. Junto a la identificación de otros factores de transcripción implicados en la señalización a través de IL-23, se han estudiado otras proteínas quinasas distintas de Jak2 y Tyk2, estas proteínas son los responsables últimos del mantenimiento de las funciones celulares. Numerosos receptores de citoquinas activan quinasas como PI3K o la quinasa mTOR<sup>(26)</sup>. No se observa un impacto de la IL-23 sobre estas vías de señalización, los miembros de estas vías como son Akt, RSK, S6K y S6 y que hemos analizado en los experimentos no muestran una activación directa mediada por IL-23. Inhibidores de las Jak quinasas se están probando en ensayos clínicos para las enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis y enfermedades inflamatorias del intestino. En particular, Ruxolitinib, un inhibidor Jak1 / Jak2, se está utilizando actualmente en la Fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de la psoriasis y la artritis reumatoide<sup>(32)</sup>. En los experimentos se ha comprobado si inhibidores definidos como específicos de Jak2 realmente inhiben Jak2 y si interfieren con las otras Jaks. En nuestros experimento se demuestra que Ruxolitinib no es específico de Jak2, en cambio, Fedratinib sí lo es, por tanto, éste sería el más indicado para inhibir IL-23 pero habría que completar los estudios con experimentos de toxicidad celular y estudios en células primarias.

Se ha demostrado que IL-23, que es producida por células dendríticas, incrementa la producción de IL-17 en cultivos de células T <sup>(7)</sup>. Es más, la IL-23 podría ser requerida para el mantenimiento del fenotipo Th17 o promover la supervivencia y proliferación de estas células. Sin embargo, en los resultados obtenidos en este trabajo no se observa un aumento de la producción de IL-17 en las condiciones con IL-23. Estos resultados pueden tener varias explicaciones, por ejemplo, el efecto de la IL-23 puede estar enmascarado por las concentraciones saturantes del resto de citoquinas que promueven las condiciones idóneas para la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> naïve. En estudios anteriores, la adición de IL-23 al cultivo de células T CD4<sup>+</sup> naïve tratadas con TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 muestra una producción de IL-17 próxima al 60%, siendo casi nula en los cultivos que están en las mismas condiciones pero son reestimulados con IL-2 <sup>(6)</sup>. Igualmente se observa un aumento del 15% en la producción de IL-17 a los 5 días en cultivos de células CD4<sup>+</sup> aisladas de ratón con IL-23 con respecto a las cultivadas en medio únicamente, no obstante la estimulación a través del TCR en estos estudios se lleva a cabo usando anti-CD3 y anti-CD28 <sup>(8)</sup>. El porcentaje de producción de IL-17 en estos experimentos es similar a nuestros datos a día 4, pero sin observar diferencias entre las condiciones con y sin IL-23. No podemos excluir que en nuestros cultivos, realizados en presencia de APCs irradiadas, las células dendríticas que se encuentran tanto en la condición con IL-23 como en la condición sin IL-23 estén secretando IL-23 de forma endógena, lo que oscurecería las diferencias producidas por la IL-23 añadida de forma exógena, para comprobar esta última hipótesis una posibilidad sería realizar los cultivos sin APC estimulando el TCR de las células T CD4<sup>+</sup> con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y evitando así la presencia de IL-23 interna en el cultivo. O sea sin APCs productoras de IL-23. Evidencias en la bibliografía involucran vías adicionales distintas de la producción de IL-17 que contribuyen a la patogenicidad Th17. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado patogénesis mediada por Th17 en ausencia de IL-17 <sup>(33, 34, 35)</sup> y esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde no se observa un aumento en la expresión de IL-23. En otros estudios, tratamiento de modelos murinos de EAE con anti-IL-17 se traduce en una protección parcial, mientras que los resultados de tratamientos contra IL-23 muestran la protección completa, por lo tanto, otras rutas activadas, que desencadenan en la fosforilación de otros factores de transcripción o genes dependientes de STAT3 distintos de IL-17 pueden promover la transcripción de otros genes que contribuyan a la inflamación crónica, independiente de la originada por STAT3 y la producción de IL-17. El uso de los inhibidores de Jak, testados en este trabajo, en los cultivos de células T CD4<sup>+</sup> supondría una vía para identificar si la inhibición de las Jak quinasas implicadas en la fosforilación de STAT3 tienen una consecuencia en la diferenciación hacia Th17.

## **CONCLUSIONES**

- La línea celular Kit225 responde a IL-23 mostrando fosforilación de STAT3 en el residuo de la tirosina 705, lo que implica su activación y translocación al núcleo. La respuesta óptima se obtiene con una estimulación con una concentración de 10ng/ml de IL-23 durante 30 minutos.
- En condiciones óptimas de respuesta a IL-23, se demuestra la fosforilación de otros factores de transcripción, STAT5, STAT4 y STAT1, diferentes de STAT3, en respuesta a IL-23.
- La IL-23 no promueve la activación de las rutas de señalización de PI3K o la quinasa mTOR en la línea celular Kit225.
- Los tres inhibidores, AZD1480, Fedratinib y Ruxolitinib, muestran actividad contra Jak2. Sin embargo, Fedratinib es el que presenta una mayor especificidad contra Jak2.
- En los ensayos con células primarias de ratones transgénicos OT2, los cultivos de células T CD4+ en condiciones de diferenciación Th17 y tratadas con IL-23 no muestran una mayor expresión de IL-17 frente a cultivos sin IL-23. Además, la IL-23 en estas condiciones no tiene un efecto mitogénico, no se observa un aumento de proliferación en las células que son tratadas con IL-23.
- La fosforilación de STAT3 inducida por IL-23 se confirma en células T CD4+ cultivadas en condiciones de diferenciación Th17, mientras que STAT4 y STAT5 no median la señalización a través de IL-23 en células primarias.

Hasta la fecha, y como ya se ha mencionado varias veces a lo largo de este trabajo, el desencadenamiento de la STAT3 eje / ROR $\gamma$ t / IL-17 es el único mecanismo regulado por IL-23 que ha sido implicado en patologías relacionadas con IL-23, pero hay evidencias en la bibliografía que involucra vías adicionales distintos de la producción de IL-17 que contribuyen a patogenicidad Th17. La identificación de otras quinasas y factores de transcripción que muestran un cambio de fosforilación en respuesta a IL-23 supone un conocimiento básico necesario para el desarrollo de fármacos basados en la inhibición o regulando de su actividad con consecuencias terapéuticas beneficiosas en pacientes que padezcan patologías autoinmunes en las que esté implicado un mecanismo mediado por IL-23.

## **REFERENCIAS**

1. Janeway's Immunobiology. Kenneth Murphy. 8ª edición, Garland Science, Londres, 2012. 335-381
2. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:236-251. 2011
3. Miossec P, Kolls JK. *Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation*. *Nat Rev Drug Discov.* 11, 763–776. 2012
4. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. *Nat Rev.* 14:585-600. 2014
5. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Senderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. *IL-6 programs Th-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. *Nature Immunol.* 8 (9).
6. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. *TGFβ in the context of an inflammatory cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells*. *Immunity* 24: 179-189. 2006.
7. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. *J Exp Med.* 201(2): 233-24. 2005
8. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M, De Sauvage FJ, Gurney AL. *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the productions of interleukin-17*. *J. Biol. Chem.* 278: 1910-1914. 2003
9. Ivanov Iyaylo I., McKenzie Brent S., Zhou L, Tadokoro Carlos E, Lepelley A, Lafaille Juan J, Cua Daniel J, Littman Dan R. *The orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. *Cell* 126: 1121-1133. 2006
10. Wiekowski MT, Leach MW, Evans L, Sullivan EL, Chen G, Vassileva JF, Bazan DM, Gorman RA, Kastelein S., Narula, Lira SA. *Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death*. *J. Immunol.* 166: 7563-7570. 2001
11. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans Jackie C, XU Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Groman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore Kevin W, Rennick D, Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. *Immunity* 13:715-725. 2000
12. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. *Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation*. *J. Exp. Med.* 203 (11):2473-2483. 2008
13. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ. *Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis*. *J. Clin. Invest.* 116:1317-1326. 2006.
14. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Groman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. *Nature* 421. 2003
15. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell A, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, Waal-Malefyt R, Moore KW. *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. *J. Immunol.* 168:5699-5708. 2002
16. Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF. *JAK protein tyrosine kinases: their role in cytokine signalling*. *Trends Cell Biol.* 4(6):207-12. 1994
17. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. *JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer*. *N. Engl. J. Med.* 368:161–70. 2013
18. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. *The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention*. *Annu. Rev. Med.* 66:311–328. 2015

19. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. *Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease*. J. Immunol. 194:21-27. 2015.
20. J Investig Dermatol Symp Proc. 16(1): S70–S72. 2013
21. Hori T, Uchiyama T, Tsudo M, Umadome H, Ohno H, Fukuhara S, Kita K, Uchino H. *Establishment of an interleukin 2-dependent human T cell line from a patient with T cell chronic lymphocytic leukemia who is not infected with human T cell leukemia/lymphoma virus*. Blood. 70(4):1069-72. 1987
22. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. *Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain genes under the control of heterologous regulatory elements*. Immunology and Cell Biology 76, 34-40. 1998
23. Ng Julian, Cantrell D. *STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes: Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727*. J. Biol. Chem. 272: 24542-24549. 1997
24. Bromberg J, Darnell Jr. *The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function*. Oncogene 19, 2468 - 2473. 2000
25. Watford Wendy T., Hissong Bruce D., Bream Jay H., Kanno Yuka, Muul Linda, O'Shea John J. *Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4*. Immunol Rev. 202: 139-156, 2004.
26. Navarro María N., Cantrell Doreen A. *Serine-threonine kinases in TCR signaling*. Nat. Immunol. 15 (9).2014
27. Derenzini E, Lemoine M, Buglio D, Katayama H, Ji Y, Davis RE, Sen S, Younes A. *The JAK inhibitor AZD1480 regulates proliferation and immunity in Hodgkin lymphoma*. Blood Cancer J. Dec; 1(12): e46. 2011
28. Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, Cullen DE, Gozo M, McDowell EP, Levine RL, Doukas J, Mak CC, Noronha G, Martin M, Ko YD, Lee BH, Soll RM, Tefferi A, Hood JD, Gilliland DG. *Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera*. Cancer Cell. 13(4):311-20. 2008
29. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA, Caulder E, Wen X, Li Y, Waeltz P, Rupar M, Burn T, Lo Y, Kelley J, Covington M, Shepard S, Rodgers JD, Haley P, Kantarjian H, Fridman JS, Verstovsek S. *Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms*. Blood. 115 (15):3109-17.2010
30. Evans GA, Garcia GG, Erwin R, Howard OM, Farrar WL. *Pervanadate simulates the effects of interleukin-2 (IL-2) in human T cells and provides evidence for the activation of two distinct tyrosine kinase pathways by IL-2*. J Biol Chem. 269(38):23407-12.1994
31. Haines CJ, Chen Y, Blumenschein WM, Jain R, Chang C, Joyce-Shaikh B, Porth K, Boniface K, Mattson J, Basham B, Anderton SM, McClanahan TK, Sadekova S, Cua DJ, McGeachy MJ. *Autoimmune Memory T Helper 17 Cell Function and Expansion Are Dependent on Interleukin-23*. Cell Rep. 3, 1378-1388. 2013
32. Punwani N, Scherle P, Flores R, Shi J, Liang J, Yeleswaram S, Levy R, Williams W, Gottlieb A. *Preliminary clinical activity of a topical JAK1/2 inhibitor in the treatment of psoriasis*. J Am Acad Dermatol. 67(4):658-64. 2012
33. Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F. *Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis*. Immunity 28: 559-570. 2008.
34. Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. *ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation*. Nat. Immunol. 12, 560–567. 2011
35. Yancopoulos G D, Ivanov I I, Wirtz S, Pouly S, Neurath M F, Littman D R, C Becker, Valenzuela D M , Murphy A J, B Becher B, Leppkes M, Hirth S. *ROR $\gamma$ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F*. Gastroenterology 136: 257-267. 2009